

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

12 • 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

ДЕКАБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

Телефон редакции:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л. А. Шанкина

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. 8-903-724-40-29

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

Художественный редактор

Е.М. Архипова

Переводчик *В. С. Нечаев*

Корректор *В. С. Смирнова*

Технический редактор *Л. В. Зюкина*

Сдано в набор 27.11.2018.

Подписано в печать 20.12.2018.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 9,00

Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

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

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

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.wakc.ru,

www.pressa-rt.ru

**Подписка на электронную версию:
elibrary.ru**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2018. № 12. 729–792.

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*), 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
12 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

DECEMBER

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

ADVERTISING DEPARTMENT

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.V. Zyukina*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief V. N. TITOV

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

EDITORIAL COUNCIL:

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



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Ариповский А. В., Дмитриев Л.Ф., Медведев О.С. Становление в филогенезе трёх пулов клеток с выражено разным поглощением и метаболизмом жирных кислот. инсулин и среднепочечные жирные кислоты. 732
- Горошинская И.А., Франциянц Е.М., Зудерман Н.Е., Ушакова Н.Д., Погорелова Ю.А., Черярина Н.Д., Лысенко И.Б., Шульга А.В. Показатели повреждения почек у больных множественной миеломой в процессе химиотерапевтического лечения. 741
- Акайзин Э.С., Гадуа А.К., Метелев А.С. Показатели летучих жирных кислот в дифференциальной диагностике гнойных осложнений панкреонекроза. 750
- Папичев Е.В., Заводовский Б.В., Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Ахвердян Ю.Р. Фетуин-А. Новый гепатокин в диагностике ревматоидного артрита. 756
- Потуткин Д.С., Типисова Е.В., Киприянова К.Е., Горенко И.Н., Попкова В.А., Елфимова А.Э., Лобанов А.А., Попов А.И., Андронов С.В. Уровни половых гормонов, глобулина, связывающего половые гормоны, антиспермальных антител и дофамина у кочующих, оседлых и местных жительниц арктических территорий в постменопаузе. 761

ЦИТОЛОГИЯ

- Круглова И.А., Денисенко А.Н., Зиновьев С.В., Уткин О.В., Князев Д.И. Возможности цитологической диагностики характера экссудата на этапе оказания экстренной помощи. 768
- Базарный В.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н., Мандра Ю.В. Цитологическая характеристика букального эпителия при хроническом генерализованном пародонтите. 773

ИММУНОЛОГИЯ

- Штрек С.В., Рудаков Н.В., Абрамова Н.В., Самойленко И.Е., Березкина Г.В., Зеликман С.Ю., Кумпан Л.В., Матущенко Е.В. Оценка эффективности серологических методов для выявления антител у больных клещевыми риккетсиозами на территориях различного риска заражения *Rickettsia sibirica*. 777

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Чагина И.А., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Афанасьев М.С., Афанасьев С.С., Скворцов А.Г. Возможности применения жидкой транспортной среды для взятия патологического материала при лабораторной диагностике дифтерийной инфекции. 783

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Логинова М.А., Павлов А.Е., Зайцева М.А., Симакова Т.С., Пильщикова Н.С., Парамонов И.В. Разработка и верификация тест-системы для высокопроизводительного HLA-генотипирования потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток. 788

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Aripovskiy A.V., Dmitriev L.F., Medvedev O.S. Formation in the phylogenesis of three pulls of cells with expressed different absorption and metabolism of fatty acids. insulin and medium chains fatty acids. 732
- Goroshinskaya I.A., Franzintz E.M., Zuderman N.E., Ushakova N.D., Pogorelova Yu.A., Cheryarina N.D., Lysenko I.B., Shulga A.V. Indicators of kidney damage in patients with multiple myeloma in the process of chemotherapeutic treatment. 741
- Akayzin E.S., Gagua A.K., Metelev A.S. The volatile fatty acids indicators in the differential diagnosis of purulent complications of pancreatic necrosis. 750
- Papichev E.V., Zavodovsky B.V., Polyakova Y.V., Seewordova L.E., Akhverdyan Y. R. Fetuin-A. Novel hepatokine in rheumatoid arthritis laboratory diagnostics. 756
- Potutkin D.S., Tipisova E.V., Kipriyanova K.E., Gorenko I.N., Popkova V.A., Elfimova A.E., Lobanov A.A., Popov A.I., Andronov S.V. Levels of sex hormones, sex hormone binding globulin, anti-sperm antibodies and dopamine in postmenopausal women of nomadic and settled aboriginal and local caucasoid populations of the Arctic territories. 761

CYTOLOGY

- Kruglova I. A., Denisenko A. N., Zinoviev S. V., Utkin O. V., Knyazev D. I. Possibilities of cytological diagnosis of the nature of the exudate at the stage of emergency. 768
- Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Maksimova A.Y., Svetlakova E.N., Mandra Yu.V. Cytological characteristic of the buccal cells in chronic generalized periodontitis. 773

IMMUNOLOGY

- Shtrek S. V., Rudakov N. V., Abramova N. V., Samoylenko I. E., Berezkina G. V., Zelikman S. Y., Kumpan L. V., Matuschenko E. V. Evaluation of the effectiveness of the serological methods for the identification of antibodies in patients with tissue rickettsiosis on the territories of a different risk of *Rickettsia sibirica* infection. 777

MICROBIOLOGY

- Chagina I.A., Borisova O.Yu., Gadua N.T., Afanasiev M.S., Afanasiev S.S., Skvortsov A.G. Possibilities of application of the liquid transport medium for capture of pathological material at laboratory diagnosis of the diphtheria infection. 783

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Loginova M.A., Pavlov A.E., Zaytseva M.A., Simakova T.S., Pilshchikova N.S., Paramonov I.V. Design and verification of the reagent kit for high-productive HLA-typing of potential donors of hemopoietic stem cells. 788

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.015.3:547.295

Титов В.Н.¹, Ариповский А. В.², Дмитриев Л.Ф.¹, Медведев О.С.³

СТАНОВЛЕНИЕ В ФИЛОГЕНЕЗЕ ТРЁХ ПУЛОВ КЛЕТОК С ВЫРАЖЕННО РАЗНЫМ ПОГЛОЩЕНИЕМ И МЕТАБОЛИЗМОМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ. ИНСУЛИН И СРЕДНЕЦЕПОЧЕЧНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

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

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Госсанэпиднадзора РФ, 142279, Оболенск Московской области;

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва

*Соматические клетки на ранних ступенях филогенеза реализовали метаболизм длинноцепочечных жирных кислот (ЖК), в первую очередь пальмитиновой насыщенной ЖК. Она доминировала в построении бислоистой мембраны клеток и как субстрат для окисления в митохондриях при наработке энергии. Позднее полиеновые ЖК включились в построение клеточной мембраны, мембран внутриклеточных органелл и стали субстратом для синтеза биологически активных эйкозаноидов. На более поздних ступенях филогенеза активированы метаболизм среднецепочечных ЖК и образование кетоновых тел как субстрата, который доступен для окисления митохондриями формируемых клеток нервной ткани при отсутствии глюкозы. На поздних ступенях филогенеза инсулин инициировал: а) превращение плотоядных предков вида *Homo sapiens* в океане в травоядный вид при жизни на суше; б) становление биологической функции локомоции и в) доминирование олеинового варианта метаболизма длинноцепочечных ЖК с более высокими кинетическими параметрами окисления. Метаболиты среднецепочечных ЖК стали гуморальными медиаторами метаболизма ЖК и формирования механизмов обратной связи в биологической функции трофологии и когнитивной биологической функции. Формирование при действии инсулина олеинового варианта метаболизма ЖК привело к совершенствованию обеспечения клеток энергией и высоким кинетическим параметрам многих видов травоядных млекопитающих, в том числе и *Homo sapiens*. Вид *Homo sapiens* не был всеядным (Omnivores); регуляторное действие инсулина при жизни на суше превратило его в травоядный вид (Herbivore), но с плотоядным (Carnivore; рыбоядным) прошлым. Семь метаболических пандемий (атеросклероз и атероматоз; метаболическая артериальная гипертензия; метаболический синдром; синдром резистентности к инсулину; ожирение; неалкогольная жировая болезнь печени и эндогенная гиперурикемия) являются нарушениями только функциональными и могут быть в большинстве случаев устранены. С позиций филогенетической теории общей патологии атеросклероз и атероматоз артерий большого будущего не имеют. Как только большинство особей вида *Homo sapiens* осознают, что в филогенезе они сформировались как травоядные и перестанут поедать избыточное количество мясной пищи, экзогенной пальмитиновой НЖК, частота заболевания в популяции начнёт снижаться. Пациенты все-таки обязаны оправдывать бинарное, биологическое наименование вида – Человек разумный. Профилактику и остальных метаболических пандемий, болезней цивилизации, можно обсуждать. Требуется время, понимание врачами того, что происходит, усердие и желание пациентов быть здоровыми.*

Ключевые слова: метаболические пандемии; жирные кислоты; глюкоза; кетоновые тела; атеросклероз.

Для цитирования: Титов В.Н., Ариповский А. В., Дмитриев Л.Ф., Медведев О.С. Становление в филогенезе трёх пулов клеток с выражено разным поглощением и метаболизмом жирных кислот. Инсулин и среднецепочечные жирные кислоты. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(12): 732-740. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-732-740>

Titov V.N.¹, Aripovskiy A.V.², Dmitriev L.F.¹, Medvedev O.S.³

FORMATION IN THE PHYLOGENESIS OF THREE PULLS OF CELLS WITH EXPRESSED DIFFERENT ABSORPTION AND METABOLISM OF FATTY ACIDS. INSULIN AND MEDIUM CHAINS FATTY ACIDS

¹National Medical Research Center for Cardiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 121552, Moscow;

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Gossanepidnadsor of the Russian Federation, 142279, Obolensk, Moscow Region Russia;

³Moscow State University M.V. Lomonosov, 119991, Moscow

*Somatic cells at the early stages of phylogenesis realized the metabolism of long-chain fatty acids (FA), primarily palmitic saturated FA. It dominated the construction of a bilayer cell membrane and as a substrate for oxidation in mitochondria during energy production. Later, polyene FAs became involved in the construction of the cell membrane, the membranes of intracellular organelles, and became the substrate for the synthesis of biologically active eicosanoids. At later stages of phylogenesis, the metabolism of medium-chain FAs is activated and the formation of ketone bodies as a substrate, which is available for oxidation by the mitochondria of the formed cells of the nervous tissue in the absence of first substrate glucose. In the later stages of phylogenesis, insulin initiated: a) the transformation of carnivorous ancestors of the species *Homo sapiens* in the ocean into a herbivorous species*

while living on land; b) the formation of the new biological function of locomotion and c) the dominance of the oleic variant of the metabolism of long-chain fatty acids with higher kinetic parameters of mitochondria oxidation. Metabolites of medium chain FA have become humoral mediators of metabolism and the formation of feedback mechanisms in the function of trophology and cognitive biological function. The formation of an oleic variant of the metabolism of fatty acids under the action of insulin led to the improvement of the energy supply of cells and the high kinetic parameters of many species of herbivorous mammals, including *Homo sapiens*. The species *Homo sapiens* was not omnivorous (Omnivores); the insulin's regulatory action during life on land has turned it into a herbivorous species (Herbivore), but with a carnivorous (Carnivore) (fish-eating) past. Seven metabolic pandemics (1. atherosclerosis and atheromatosis; 2. metabolic arterial hypertension; 3. metabolic syndrome; 4. insulin resistance syndrome; 5. obesity; 6. nonalcoholic fatty liver disease and 7. endogenous hyperuricemia) are only functional disorders and can be, in most cases, eliminated. From the standpoint of the phylogenetic theory of general pathology, atherosclerosis and atheromatosis of the arteries have no great future. As soon, as the majority of individuals of the *Homo sapiens* species realize that in phylogenesis they have formed as herbivores and stop eating excessive amounts of meat food, exogenous palmitic FA, the incidence in the population will begin to decrease. Patients are still obliged to justify the binary, biological name of the species - reasonable man. Prevention and other metabolic pandemics, diseases of civilization, can be discussed. It takes time, an understanding of what happens by the doctors, diligence and the desire of patients to be healthy.

Key words: metabolic pandemics; fatty acids; glucose; ketone bodies; atherosclerosis.

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

For citation: Titov V.N., Aripovskiy A.V., Dmitriev L.F., Medvedev O.S. Formation in the phylogenesis of three pulls of cells with expressed different absorption and metabolism of fatty acids. *Insulin and medium chains fatty acids. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (12): 732-740 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-732-740>

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

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

Received 04.12.2018

Accepted 20.12.2018

Согласно предложенной нами филогенетической теории общей патологии [1], на ступенях филогенеза далеко не одновременно, с интервалом в миллионы лет, возможно в иной последовательности, произошло становление *in vivo* биологических функций. Мир, в котором мы живем, выраженно семеричен: семь цветов радуги, семь нот в музыке, семь дней в неделе, такова же длительность сотворения мира (6 дней + выходной), семь-Я – структурная единица социального общества вида *Homo sapiens*. Биологических функций мы насчитали тоже семь:

биологическая функция трофологии (питания);

биологическая функция гомеостаза;

биологическая функция эндэкологии («чистота» межклеточной среды);

биологическая функция адаптации;

биологическая функция продолжения вида (размножения);

биологическая функция локомоции и

когнитивная биологическая функция. Проявлением когнитивной функции в апогее её является интеллект.

Принципу семеричности соответствует и число метаболических пандемий, болезней «цивилизации», основу патогенеза которых составляет нарушение в первую очередь метаболизма жирных кислот (ЖК). Функциональные нарушения включают:

атеросклероз и атероматоз;

метаболическую артериальную гипертензию;

метаболический синдром;

синдром резистентности к инсулину;

ожирение;

неалкогольную жировую болезнь печени и

эндогенную гиперурикемию.

Если мы говорим о липидах, ими являются все ЖК и соединения, в состав которых ЖК входят [2]. ЖК в отличие от химиков мы подразделяем не на три, а на четыре группы: а) насыщенные ЖК (НЖК) двойных связей – ДС (C=C) не содержат; б) мононенасыщенные ЖК (МЖК) с одной ДС; в) ненасыщенные ЖК (ННЖК)

с двумя – тремя ДС и г) полиеновые ЖК (ПНЖК) с четырьмя – шестью ДС. Биохимические реакции липидов позволяют формировать процессы метаболизма; физико-химические свойства липидов с ранних ступеней филогенеза предопределили биохимические их превращения при формировании как бислойных клеточных, плазматических мембран *in vivo*, мембран митохондрий, так и монослойных мембран. Это мембрана ядра, лизосом, пероксисом, стенок канальцев эндоплазматического ретикулаума и монослойные мембраны «капель липидов».

В биологической функции трофологии (питания) различие биологических реакций экзо- и эндотрофии (внешнее и внутреннее питание) сформировано на ранних ступенях филогенеза, на аутокринном, клеточном уровне, первом уровне относительного «биологического совершенства». Большинство живущих на земле видов животных – экзотрофы; все субстраты, которые необходимы для реализации процессов жизнеобеспечения, они поглощают извне, из окружающей среды. Полными автотрофами, которые обеспечивают себя субстратами для формирования структур и потребностей клеток в энергии, являются только клетки растений. В биологической функции трофологии (функции питания) две биологические реакции экзо- и эндотрофии – два разных этапа биохимических превращений экзогенных субстратов, метаболизма ЖК и липидов, протеинов и углеводов [3].

Биологическая функция трофологии, биологические реакции экзо- и эндотрофии. В биологической функции трофологии первой реализована биологическая реакция экзотрофии, процесс пищеварения и метаболизм ЖК, усвоение экзогенных субстратов. Это деполимеризация (окисление) макромолекул пищи, липолиз неполярных молекул, гидролиз надмолекулярных комплексов при переносе полярных и неполярных липидов в межклеточной среде и при транспорте неполярных (полярных) липидов через плазматическую мембрану клеток. При переносе все ЖК и липиды в гидрофильной среде, физико-химически связывают липидпереносящие,

специфичные протеины: альбумин и семейство аполипопротеинов (апо).

Апо – семейство ранних, стационарных (апоА-I) на ступенях филогенеза функциональных протеинов и более поздних (апоС-48 и апоС-100) со специфичной первичной, вторичной структурой и конформационными изменениями третичной структуры [4]. АпоА связывают только полярные липиды; апоВ – неполярные липиды. В гидрофильной среде апо за счёт формирования β-складчатой структуры принимает дискообразную форму; одна сторона «диска» становится гидрофильной, другая – гидрофобной. На гидрофобной стороне α-спирали связывают липиды, преимущественно неполярные триглицериды (ТГ). На гидрофильной стороне диска формируется домен-лиганд; связывая его рецепторами на плазматической мембране, клетки активно поглощают ЖК в основном в форме неполярных липидов. Среди липидов доминируют: а) эфиры ЖК с трёхатомным спиртом глицерином – ТГ и б) эфиры ЖК с одноатомным спиртом холестерином (ХС): ЖК, этерифицированные ХС, моно- и полиеновые эфиры ХС (моно- и поли-ЭХС). Функционально все липопротеины (ЛП), липидпереносящие молекулы являются в принципе бислойной структурой белок:липид. В процессе переноса ЖК и липиды *in vivo* в гидрофильной межклеточной среде в составе ЛП подвержены биохимическим превращениям [5].

Клетки поглощают ЖК и липиды путём пассивного, активированного и активного (рецепторного) эндоцитоза в форме неполярных ТГ – эфиров трёх ЖК со спиртом глицерином и с одноатомным спиртом ХС в форме моно-ЭХС, поли-ЭХС. После переноса клетки депонируют ЖК в гидрофильной среде цитоплазмы в форме главным образом капель липидов. Состоят они из гидрофобных ТГ и отделены от цитоплазмы монослойной мембраной из фосфатидилхолина. Депонирование длинноцепочечных ЖК в функционально специализированных клетках рыхлой соединительной ткани (РСТ) происходит также во время реализации биологической реакции экзотрофии. На всём протяжении постпрандиальной гиперлипипротейнемии (ГЛП), в биологической реакции экзотрофии все потребности клеток в энергии обеспечивает метаболизм только экзогенных ЖК в форме незэтерифицированных ЖК (НЭЖК); в кровотоке их связывает липидпереносящий белок альбумин. В биологической же реакции эндотрофии клетки в митохондриях окисляют только эндогенно запасённые ЖК.

Согласно особенностям структуры альбумин функционально предназначен для переноса С16–С18 длинноцепочечных ЖК в двух гидрофобных каналах. Альбумин не может переносить более длинные С20–С22 ПНЖК в силу их специфичной конформации, пространственной, стерической формы молекулы, при наличии четырёх – шести ДС в цепи атомов углерода. Альбумин менее специфичными, лишь гидрофобными взаимодействиями может связывать ещё несколько НЭЖК. Основная масса ЖК в форме неполярных ТГ *in vivo* депонирована в клетках; лишь малая доля ТГ циркулирует в межклеточной среде. Альбумин переносит только полярные НЭЖК; неполярные же ТГ апо структурируют в ЛП. Большинство НЭЖК, которые альбумин переносит в крови в процессе реализации биологической реакции экзотрофии, являются экзогенными. При реализации биологической реакции экзотрофии:

а) большая часть экзогенных ЖК в форме неполярных липидов депонирована *in vivo* в двух функциональ-

но разных депо: висцеральных жировых клетках (ВЖК) сальника и инсулинзависимых подкожных адипоцитах (ИПА) [6];

б) меньшая часть экзогенных НЭЖК, которые в межклеточной среде переносит альбумин, покрывает потребности клеток в энергии путём окисления их в митохондриях. Важно понять, что потребности всех клеток в энергии в реализации биологической реакции экзотрофии покрыты за счёт окисления только экзогенных ЖК. На ступенях филогенеза в реакции экзотрофии у всех (от бактерий до млекопитающих) реализованы три варианта пищеварения: наиболее раннее – внеклеточное пищеварение; более позднее – внутриклеточное и специфичный процесс мембранного, органного пищеварения [7]. Эти варианты в биологической реакции экзотрофии реализованы у всех видов животных, в том числе и у *Homo sapiens*.

Биологическая же реакция эндотрофии, внутреннего питания активна *in vivo* более длительно, в течение всего времени, кроме периода поедания пищи и постпрандиальной ГЛП. В это время происходит усвоение пищи: липолиз, всасывание, перенос в среде и депонирование ЖК в ВЖК сальника и ИПА. В реализации биологической реакции эндотрофии все потребности *in vivo* в энергии покрывает окисление в митохондриях тех ЖК, которые депонированы ранее, в биологической реакции экзотрофии. Активна биологическая реакция эндотрофии в условиях длительного голодания, а также в период гибернации (зимней спячки) животных.

Ранний в филогенезе пул ВЖК предназначен для обеспечения всех клеток энергией при реализации шести (из семи) биологических функций. И только обеспечение энергией биологической функции локомоции осуществляют ИПА. В формировании ИПА и реализации специфичной функции регуляторное действие осуществляет инсулин. На ступенях филогенеза пул ВЖК сформировался до начала становления *in vivo* регуляторной функции инсулина; ВЖК на плазматической мембране активных рецепторов к инсулину не имеют.

Перенос, поглощение соматическими клетками ЖК в форме НЭЖК в биологических реакциях экзо- и эндотрофии. Инсулин инициировал формирование биологической функции локомоции и систему поперечнополосатых, скелетных миоцитов, движение животных с высокими кинетическими параметрами [8]. В свою очередь биологическая функция локомоции оказала влияние на совершенствование иных функций *in vivo*. Биологическая роль инсулина состоит в том, что при жизни животных в океане, когда синтеза инсулина не было:

а) все потребности организма в энергии обеспечивал пальмитиновый вариант метаболизма ЖК; С16:0 ЖК клетки окисляли в матриксе митохондрий, в цикле Кребса и физико-химической дыхательной цепи, покрывая все потребности в энергии. НЖК в цепи атомов углерода ДС не содержит;

б) при жизни на суше инсулин экспрессировал биохимические реакции, которые обеспечили превращение всей синтезированной клетками *in situ de novo* пальмитиновой НЖК в ω-9 С18:1 цис-олеиновую МЖК;

в) биологическое предназначение инсулина – превращение плотоядных (рыбоядных) видов (*Carnivore*) при жизни в океане в травоядные виды (*Herbivore*) при жизни на суше. *Homo sapiens* – не всеяден (*Omnivore*); биология таких видов не создала, это nonsense. Человек разумный в филогенезе травояден, но с плотоядным (рыбоядным)

прошлым; мясоедом человек никогда не был. При злоупотреблении пациентами мясной пищей, говядиной и жирными молочными продуктами с высоким содержанием пальмитиновой НЖК содержание её в гепатоцитах, ВЖК и ИПА выражено увеличивается и формируется пальмитиновый вариант метаболизма ЖК.

Инсулин физиологично превращает в олеиновую МЖК только эндогенно синтезированную пальмитиновую НЖК, но не экзогенную пальмитиновую НЖК пищи. У пациентов при избыточном поедании мясной и жирной молочной пищи можно наблюдать: а) пальмитиновый вариант метаболизма ЖК и б) афизиологичное формирование гепатоцитами пальмитиновых липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). Химически неактивная пальмитиновая НЖК активирует *in vivo* биологическую функцию эндоэкологии, биологическую реакцию воспаления, экспрессию синтеза С-реактивного белка и фактора некроза опухоли- α (ФНО α) [9]. Такая пища является причиной повышения содержания в плазме крови ТГ, холестерина в составе ЛПНП (ХС-ЛПНП) и формирования выраженной ГЛП преимущественно Пб типа с развитием атеросклероза и атероматоза коронарных артерий. Мы полагаем, на ступенях филогенеза последовательно произошло формирование трёх пулов функционально разных клеток, перенос, депонирование и потребление которыми ЖК имеет существенные различия.

Пул соматических клеток (производных архей) и метаболизм ЖК. Наиболее ранним на ступенях филогенеза пулом клеток, которые сформировались в глубинах океана, при высокой температуре, в темноте являются потомки наиболее ранних одноклеточных, анаэробных архей; все они были гетеротрофами. Все что необходимо, они поглощали извне: из внешней среды и из межклеточной среды *in vivo*. Соматические клетки активно депонируют ЖК в каплях липидов цитоплазмы в форме неполярных ТГ. Археи – прародители соматических клеток и у вида *Homo sapiens*. Эти клетки окисляли (окисляют) в митохондриях ацетил-КоА, который образован при метаболизме экзогенных, длинноцепочечных С16–С18 ЖК. Соматические клетки поглощают ЖК в форме ТГ в составе главным образом пальмитиновых липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) путём активного апоВ-100 эндоцитоза. Метаболизм ЖК в клетках регулирован на клеточном, аутокринном уровне, на первом уровне относительного биологического совершенства. Каждая клетка запасает ЖК для себя, используя их в первую очередь как субстрат для наработки энергии (макроэргического АТФ) и построения структур.

ЖК, которые запасают соматические клетки в каплях липидов, являются преимущественно две: длинноцепочечная пальмитиновая НЖК и олеиновая МЖК. Среди ЖК, запасание и метаболизм которых активно реализуют соматические клетки, преобладают длинноцепочечные С16 НЖК, С18 МЖК и С20–С22 ПНЖК с четырьмя – шестью ДС [10]. Наиболее рано на ступенях филогенеза *in vivo* предшественники соматических клеток начали метаболизм длинноцепочечных НЖК, МЖК и ПНЖК. Гетеротрофы, анаэробы архей имели в цитоплазме митохондрии; органеллы имеют отдельный от архей геном и бислойную мембрану: она затрудняет поглощение митохондриями пальмитиновой НЖК. Будучи анаэробами, митохондрии в цикле трикарбоновых кислот (цикле Кребса) и в физико-химических реакциях дыхательной цепи активно окисляли ЖК, нарабатывая оптимальные количества макроэргического АТФ.

В филогенезе ни одна из клеток так и не отработала способ запасаения энергии, хотя бы в форме АТФ. Соматические клетки вынуждены депонировать субстраты для наработки энергии в форме гидрофобных ТГ в каплях липидов в цитоплазме. Нарбатывать же АТФ клеткам приходится *extempore (Cito!)*, в момент, когда потребность в энергии возрастает и порой существенно. И какие из клеток (одноклеточных) нарабатывают в митохондриях АТФ с более высокой константой скорости реакции более эффективно, те и доминируют на ступенях филогенеза. Происходит это и в паракринно регулируемых сообществах (ПС) функционально разных клеток, структурных и функциональных единиц каждого из органов *in vivo* на втором уровне относительного биологического совершенства.

Поглощение соматическими клетками *in vivo* ЖК в форме ТГ в составе ЛП, в биологической функции трофологии, в биологической реакции экзотрофии; депонирование их в каплях липидов и освобождение ЖК после липолиза ТГ является сложным, многоэтапным процессом. В реакциях *поглощение* → *депонирование* → *освобождение* задействованы многие ферментные системы. Это дало авторам основание сравнивать синтез биологически активных метаболитов в ВЖК и ИПА едва ли не с функцией эндокринных желез.

Липолиз активно происходит в небольших липидных каплях с большой поверхностью монослойной мембраны; в крупных каплях, особенно если капля занимает всю клетку, гидролиз ТГ практически не происходит. В таких жировых клетках формируется афизиологичный процесс – стресс эндоплазматического ретикулума. Такие жировые клетки погибают по типу апоптоза и их утилизируют *in situ* оседлые макрофаги, реализуя биологическую реакцию воспаления, биологическую функцию эндоэкологии. Освобождение из жировых клеток олеиновой МЖК происходит с более высокой константой скорости реакции, по сравнению с таковым у пальмитиновой НЖК.

Когда соматические клетки начали синтез пальмитиновой НЖК *in situ de novo* из активированного ацетил-КоА, они использовали раннюю на ступенях филогенеза, специфичную синтетазу ЖК. Мультиферментный комплекс реализует синтез по принципу: один субстрат С2 ацетил-КоА → один продукт С16:0 пальмитиновая НЖК. Освобождение в синтезе среднецепочечных С8–С14 ЖК не происходит. Можно полагать, что на ранних ступенях филогенеза у соматических клеток при доминировании длинноцепочечных ЖК потребности в ЖК со средней длиной цепи не было, как, вероятно, и потребности в короткоцепочечных С4–С6 ЖК [11]. В глубинах океана единственным субстратом для наработки клетками энергии были ЖК; в темноте синтез глюкозы ещё не начал.

Пул клеток нервной системы – производных от фотосинтезирующих автотрофов: глюкоза, кетоновые тела и среднецепочечные ЖК. Через миллион лет, когда сформированный в глубинах океана «первичный бульон» из органических молекул достиг освещаемых солнцем участков на поверхности океана, более поздние на ступенях филогенеза клетки поверхностных вод сформировали иной пул бактерий автотрофов. В отличие от архей бактерии автотрофы, используя воду, углекислый газ и кванты энергии солнца отработали физико-химические реакции фотосинтеза и стали синтезировать глюкозу, используя её как субстрат для наработки энергии. Длительное время автотрофы синтезировали макроэргический АТФ в реакции брожения. В процессе фотосинтеза глюкозы автотрофы одновременно выделяли атомарный О₂.

Производными от автотрофов являются астроциты, нейроны, глиальные клетки нервной ткани. Несмотря на то что с позиций физической химии автотрофы в филогенезе являются более «продвинутыми», они на миллионы лет более поздние, чем гетеротрофы, и митохондрии в цитоплазме они не имели. Продуцируемый автотрофами кислород явно не способствовал функционирования анаэробных архей и аэробных автотрофов в единой среде решены «историческим» в филогенезе симбиотическим слиянием бактерий автотрофов и архей. В результате, в течение миллионов лет автотрофы симбиотически «приватизировали» митохондрии с их геномом. Далее для наработки энергии (макроэргического АТФ) автотрофы стали использовать не реакции брожения глюкозы (гликолиза), а реакции цикла трикарбоновых кислот и физико-химические реакции дыхательной цепи митохондрий. Последующие поколения соматических клеток, потомков архей, из анаэробов стали аэробами; они, как и прежде, нарабатывали в митохондриях макроэргический АТФ, но уже в аэробных условиях.

Казалось бы, имеющиеся различия в реакциях синтеза макроэргического АТФ в митохондриях потомков автотрофов (клетками нервной ткани) и потомков архей (соматических клеток) были устранены, однако не в полной мере. Несмотря на сходные условия для соматических клеток и клеток нервной ткани *in vivo* в едином пуле межклеточной среды, существенные различия в обеспечении клеток энергией остались. Несмотря на то, что функция митохондрий в соматических клетках и в клетках нервной системы является единой, обеспечение органелл субстратами для наработки АТФ осталось разным. Разными остались и физико-химические параметры межклеточной среды клеток: а) единый пул межклеточной среды соматических клеток и б) локальный пул спинномозговой жидкости для клеток нервной ткани.

Если митохондрии соматических клеток окисляют главным образом длинноцепочечные С16–С18 НЖК и МЖК в реакции, к примеру, С18:1 олеиновая МЖК → митохондрии → АТФ, то митохондрии астроцитов и нейронов окисляют ацетил-КоА, который образован из глюкозы. Происходит это в реакциях: глюкоза → гликолиз (9 реакций) → лактат → пируват → пируватдегидрогеназный комплекс цитоплазмы → ацетил-КоА → митохондрии → АТФ. В принципе соматические клетки, потомки архей, окисляют в митохондриях ЖК, а клетки нервной ткани, потомки автотрофов, окисляют по большому счету глюкозу.

Сколько миллионов лет соматические и нервные клетки сосуществовали *in vivo* в едином пуле межклеточной среды в приватизированном каждой особью кусочке третьего мирового океана при выходе на сушу, сказать трудно. Столь же проблематично назвать истинную причину того, какие несогласованные физико-химические параметры послужили основой формирования гематоэнцефалического барьера — бислойной структуры астроциты:эндотелий и отделила от единого пула межклеточной среды малый пул спинномозговой жидкости. По физико-химическим параметрам пул спинномозговой жидкости, в которой функционируют все нервные клетки, почти идентичен первичной моче, т. е. плазме крови, профильтрованной через базальную мембрану гломерул нефрона.

Вероятно, такая среда больше соответствовала (напоминала) поверхностным слоям океана, в которых произошло формирование первых автотрофов. Вероятно,

одноклеточные организмы – растения, пластиды с подобием хлорофилла – осуществили фотосинтез глюкозы и O_2 из $H_2O + CO_2 +$ фотоны солнечного света. Соматические же клетки с самых начальных ступеней филогенеза (филогенез – единый анамнез всего живого на планете Земля) пребывали в насыщенной органическими молекулами глубоководной среде океана при высоком содержании длинноцепочечных ЖК, преимущественно ПНЖК. Только из них в составе полярных липидов (глицеридов – фосфолипидов) можно сформировать бислойную клеточную мембрану.

Когда у травоядных видов, в том числе у *Homo sapiens*, глюкоза в биологической реакции экзотрофии (питания) является основным субстратом для наработки клетками энергии и синтеза ЖК, проблем с субстратом для наработки нервными клетками энергии нет. Однако в условиях голодания и реализации биологической реакции эндотрофии, во время биологической гибернации (зимняя спячка) запасы глюкозы нервные клетки не формируют; в этих условиях образование дефицита глюкозы и АТФ в пуле спинномозговой жидкости становится реальностью.

Если соматические клетки и запасают глюкозу, то делают они это, согласно аутокринной регуляции, «для себя»; депонированной глюкозой соматические клетки не делятся. Пул глюкозы, который в условиях гипогликемии при действии глюкагона может быть освобожден в кровоток, далеко не на ранних ступенях филогенеза, депонируют только перипортальные гепатоциты. Освобождение глюкозы в межклеточную среду регулирует гормон глюкагон [12], активируя реакции гликогенолиза – гидролиз гидрофильного полимера глюкозы гликогена. Синтезируют глюкагон α -клетки островков поджелудочной железы; происходило это на миллионы лет раньше, чем β -клетки начали синтез инсулина.

Могут ли митохондрии клеток нервной системы окислять ЖК, сказать трудно; в спинномозговой жидкости ни средне-, ни длинноцепочечных ЖК нет. Можно прочесть, что гематоэнцефалический барьер является преградой для перехода ЖК из единого пула межклеточной среды, из локального внутрисосудистого пула в пул спинномозговой жидкости [13]. Реально же преградой для перехода ЖК в нервные клетки является, мы полагаем, сама спинномозговая жидкость. В столь гидрофильной среде стабильно растворимыми могут быть только С4 ЖК – полярные кетоновые тела (КТ). Надо признать, что всё количество даже очень длинноцепочечных ЖК (вплоть до С36 ЖК с двенадцатью ДС) нервные клетки синтезируют только из С4 кетоновых тел [14].

Митохондрии клеток нервной ткани эффективно поглощают и окисляют КТ, нарабатывая оптимальное количество АТФ. В условиях дефицита глюкозы опять-таки соматические клетки, выполняя биологическую функцию адаптации, биологическую реакцию компенсации, активируют биохимические реакции глюконеогенеза из аминокислот (из аланина), из КТ, из среднецепочечных ЖК. Некоторые виды млекопитающих (не *Homo sapiens*) реализуют биохимические реакции глюконеогенеза из ЖК, из КТ [15]. Происходит это в гепатоцитах в последовательности реакций: ацетоацетат → ацетон → ацетол → метилглиоксаль → глиоксаль → D-глюкоза [16].

Если уровень глюкозы в спинномозговой жидкости становится низким, гуморальные медиаторы активируют компенсаторные реакции на втором уровне относительного биологического совершенства, на уровне функционального единения органов, систем и синтез КТ

[17]. Для этого соматические клетки активируют синтез *de novo* среднецепочечных ЖК; ранее они эти ЖК не делали. Возможно, для синтеза среднецепочечных ЖК гепатоциты используют и избыточное количество ацетил-КоА, которые могут нарабатывать клетки в последовательности компенсаторных реакций ацетил-КоА → ацетоацетил-КоА → малонил-КоА → среднецепочечные ЖК. Оптимально, видимо, синтез большого количества КТ из длинноцепочечных ЖК *in vivo* не происходит. Не реально считать, что образование КТ из длинноцепочечных ЖК происходит путём β-окисления ЖК с карбоксильного конца молекулы по типу С16:0 ПНЖК → С14:0 миристиновая НЖК → С12:0 лауриновая НЖК и т. д.

Синтетазы ЖК *in vivo* представлены двумя функциональными вариантами: первый из них – полиферментный комплекс с мол. массой ≈ 500 кДа компактной структуры, из которого не удаётся фракционировать отдельные энзимы. Эту синтетазу и используют соматические клетки при синтезе ЖК как С2 ацетил-КоА → С16:0 ПНЖК [18]. Вторая группа включает синтетазы ЖК, в которых, при фракционировании протеинов можно выделить отдельные энзимы; все ферменты синтетазного комплекса ЖК функционируют в виде отдельных полипептидов. Можно полагать, что на ранних ступенях филогенеза все соматические клетки (производные от архей) в синтезе ацетил-КоА → С16:0 пальмитиновая НЖК использовали первую синтетазу ЖК. На более поздних ступенях филогенеза при синтезе среднецепочечных ЖК соматические и нервные клетки задействовали второй вариант синтетазы. Это соответствует в биологии методологическому принципу биологии – единая технология становления в филогенезе функциональных систем.

Субстратом для синтеза КТ при физиологичном уровне глюкозы в кровотоке является вновь синтезированный, далеко не ранний, пул среднецепочечных ЖК. Наиболее ранним субстратом для наработки энергии клетками этого пула является глюкоза, компенсаторным пулом для наработки нервными клетками энергии при окислении в митохондриях являются КТ; формируют их соматические клетки при метаболизме среднецепочечных ЖК. Для компенсации обеспечения энергией клеток нервной системы в соматических клетках *in vivo* образование КТ происходит при метаболизме сформированного на далеко не ранних ступенях филогенеза пула кетогенных ЖК. Это среднецепочечные ЖК: С8 каприловая ЖК, С10 каприновая ЖК, С12:0 лауриновая и С14:0 миристиновая ЖК.

В рамках биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации, соматические клетки формируют субстраты и для наработки энергии нервными клетками; происходит это в процессе синтеза и метаболизма среднецепочечных ЖК. Реализуют эти реакции, вероятно, более поздние на ступенях филогенеза перипортальные гепатоциты и, возможно, оседлые макрофаги Купффера в печени [19]. Все нервные клетки *in vivo* регулированы на уровне полиорганной нервной системы; формирование её происходило в несколько этапов. На это указывают, мы полагаем, многие анатомические образования головного мозга. Наиболее ранним субстратом для наработки энергии нервными клетками является глюкоза, компенсаторным, дополнительным пулом для наработки нервными клетками энергии при окислении в митохондриях являются КТ; формируют кетоновые тела соматические клетки при метаболизме С8–С12 ЖК.

И хотя в полной мере действие среднецепочечных ЖК и одноимённых ТГ *in vivo* пока не понято, пища,

обогащённая ими, эффективна у пациентов с диабетом 1-го типа, при синдроме резистентности к инсулину и при нейродегенеративной патологии. Лауриновая С12:0 ЖК составляет половину всех ЖК в кокосовом масле. В популяции жителей юго-востока Азии, которые постоянно используют кокосовое масло в пищу, низка частота патологии сердечнососудистой системы. При регуляторном приёме с пищей лауриновой ЖК в организме формируется состояние умеренного ацидоза (пониженные величины рН межклеточной среды) и выраженное нейропротективное действие [20].

В отличие от длинноцепочечных ЖК, клетки не депонируют среднецепочечные ТГ ни в ВЖК сальника, ни в инсулинзависимых подкожных адипоцитах. Среднецепочечные ЖК быстро окисляют митохондрии; образование ацетил-КоА клетки используют для образования КТ, активируя и реакции термогенеза в оранжевых и бурых адипоцитах. Среднецепочечные ЖК и одноимённые ТГ не являются компонентами апоВ-100 ЛП и редко депонированы в ВЖК; вместе с тем в ВЖК свиней запасена в основном С14:0 миристиновая НЖК. Эксперименты с животными и наблюдения в клинике показали: приём с пищей среднецепочечных ТГ более физиологичен, чем приём длинноцепочечных ТГ, поскольку повышает содержание ХС-ЛПВП. Пища, обогащённая среднецепочечными ТГ, является оптимальной для повышения содержания КТ в крови, в спинномозговой жидкости независимо от содержания в пище глюкозы. Формирование КТ клетками можно реализовать при активации метаболизма среднецепочечных ЖК [21]. Кокосовое масло оказывает позитивное действие на функцию сердечно-сосудистой системы, предотвращая формирование атеросклероза и атероматоза артерий. Эффективным в профилактике патологии сердечно-сосудистой системы является снижение в пище количества пальмитиновой ЖК, увеличение олеиновой ЖК, полиеновых и среднецепочечных ЖК [22].

С8–С12 ЖК – более водорастворимы, чем ЖК с длинной цепью С16–С22; в гидрофильной среде содержимого кишечника, в среде с эндогенными детергентами (желчными кислотами) они не формируют мицелл; это обеспечивает быстрое всасывание их энтероцитами тонкой кишки [23]. Среднецепочечные ЖК являются слабыми электролитами; они, как правило, ионизированы при нейтральном значении рН; это увеличивает их растворимость. Среднецепочечные ТГ имеют общее число атомов углерода С24–С30; только несколько процентов ТГ в кокосовом масле имеют такую длину. Позиционные формы ТГ с лауриновой С12 ЖК имеют большее число атомов С, и метаболизм их в клетках происходит иначе. Более низкая молекулярная масса ТГ со средней длиной цепи ЖК является оптимальным субстратом для гидролиза панкреатической липазой. Эпидемиологические данные показали, что поедание кокосового масла позитивно сказывается на функции сердечно-сосудистой системы.

В последнее время полагают, что С14:0 миристиновую НЖК на поздних ступенях филогенеза млекопитающие, но не *Homo sapiens*, используют в реакциях элонгации при синтезе *in vivo* ПНЖК из субстратов [24], из растительных, экзогенных ω-6 С18:2 линолевой и ω-3 С18:3 α-линоленовой ННЖК [25]. Кроме того, полагают, что не только С16:0 пальмитиновая, но и С14:0 миристиновая НЖК может участвовать в реакции миристилирования протеинов для: а) увеличения их гидрофобности; б) эффективного связывания с липидами и в) формирования специфических липидов – гуморальных медиаторов [26].

Грелин – пептидный гормон регуляции метаболизма, эндокринной регуляции функции желудочно-кишечного тракта [27]. Синтезируют его клетки слизистой оболочки фундального (*fundus*) отдела желудка. Содержание грелина в плазме крови возрастает перед приёмом пищи и уменьшается после еды. Возможно, имеет место функциональное единение действия грелина с лептином, гуморальным медиатором ВЖК и с адипонектином, который секретируют ИПА [28].

Мы полагаем, что в когнитивной биологической функции, они вместе регулируют позиционирование особи одновременно в окружающей, внешней среде и единение с внутренней средой организма. Гуморальные медиаторы из среднепечочных ЖК регулируют количество поглощаемой пищи, в том числе и чувство голода [29]. Вероятно, они являются компонентами единого, не до конца сформированного механизма обратной связи (*feedback mechanism*) в реализации биологической функции трофологии. Грелин секретирует и дугообразное ядро гипоталамической области головного мозга, исполняя, возможно, роль тропного гормона, который регулирует синтез соматотропного гормона (гормона роста) базофилами гипофиза [30]. Рецепторы к грелину расположены в вентромедиальном отделе гипоталамуса [21]. Они, полагают, реализуют действие гуморального медиатора, начиная с метаболизма субстратов обеспечения потребности клеток в энергии (ЖК, глюкоза и АТФ) и заканчивая регуляцией сокращения гладкомышечных клеток в органах желудочно-кишечного тракта [31]. Грелин характеризуют как гормон функционального состояния голода [32]. Ещё предстоит обобщить позитивное действие *in vivo* приёма экзогенных С8-С14 жирных кислот и ТГ [33], включая, возможно, функциональное различие действия каприловой, каприновой, лауриновой и миристиновой среднепечочных ЖК.

Пул поперечнополосатых, скелетных миоцитов, действие инсулина, депонирование и метаболизм. На поздних ступенях филогенеза произошло формирование третьего пула функционально специализированных клеток – скелетных миоцитов; реализуют они биологическую функцию локомоции, движения за счёт сокращения поперечнополосатых миоцитов. На поздних ступенях филогенеза биологическую функцию локомоции инициировал вновь экспрессированный гормон инсулин. Становление биологической функции инсулина, формирование биологической функции локомоции, мы полагаем, это существенное звено в превращении плотоядных (рыбоядных) видов океана в травоядные при жизни на суше [34].

Биохимическое предназначение инсулина – обеспечение энергией большого пула инсулинзависимых клеток; гормон призван реализовать биологическую функцию локомоции. Все зависимые от гормона клетки на плазматической мембране имеют активные рецепторы к инсулину. Инсулинзависимыми *in vivo* клетками стали: поперечнополосатые, скелетные миоциты; синцитий кардиомиоцитов; перипортальные гепатоциты; подкожные адипоциты; оседлые специализированные макрофаги Купффера в печени. Становление биологической функции локомоции повлекло совершенствование *in vivo* и иных биологических функций. Для всех зависимых от инсулина клеток гормон сформировал единую систему снабжения субстратами – длинноцепочечными ЖК. Основу совершенства инсулином метаболизма длинноцепочечных ЖК составляет замена *in vivo* менее эффективного пальмитинового варианта метаболизма ЖК на высокоэффективный олеиновый вариант. При действии инсулина:

а) гепатоциты из экзогенной глюкозы, как и прежде, синтезируют *in situ de novo* пальмитиновую НЖК, но тут же превращают её в олеиновую МЖК;

б) апоВ-100 в гепатоцитах структурирует олеиновую МЖК в форме олеиновых ТГ в составе олеиновых ЛПОИП, секретируя их в кровотоки;

в) в крови постгепариновая липопопротеинлипаза гидролизует часть ТГ в составе олеиновых ЛПОИП, формируя апоЕ/В-100 лиганд;

г) зависимые от инсулина клетки, связывая лиганд своими апоЕ/В-100 рецепторами, поглощают лигандные, олеиновые ЛПОИП путём апоЕ/В-100 эндоцитоза. Напомним, что до действия инсулина пальмитиновые ЛПОИП поглощали клетки в форме одноимённых ЛПОИП путём апоВ-100 эндоцитоза. И если до инсулина перенос пальмитиновых ТГ проходил по пути *гепатоциты* → *пальмитиновые ЛПОИП* → *ЛПОИП* → *апоВ-100 эндоцитоз* → *клетка*, то при действии инсулина перенос олеиновых ТГ осуществлён по иному пути: *гепатоциты* → *олеиновые ЛПОИП* → *апоЕ/В-100 эндоцитоз* → *клетка*. Обеспечение субстратами клеток, которые реализуют биологическую функцию локомоции, осуществлено *in vivo* в два этапа.

Первый этап в реализации биологической реакции экзотрофии – перенос эндогенной олеиновой МЖК в форме олеиновых ТГ в составе одноимённых ЛПОИП и поглощение их в первую очередь инсулинзависимыми подкожными адипоцитами путём апоЕ/В-100 эндоцитоза. Поскольку вид *Homo sapiens* на ступенях филогенеза сформировался как травоядный с плотоядным прошлым, инсулинзависимые олеиновые ЛПОИП физиологично переносят к клеткам и оптимальное количество пальмитиновой НЖК. Позиционными формами ТГ в олеиновых ЛПОИП являются: олеил-олеил-олеат глицерол (ООО), олеил-олеил-пальмитат (ООП), пальмитоил-олеил-олеат (ПОО) и пальмитоил-олеил-пальмитат (ПОП); суммировано это ООО–ООП–ПОО–ПОП. Так, первым этапом обеспечения субстратами энергии скелетных миоцитов, кардиомиоцитов является централизованное депонирование ЖК в форме преимущественно олеиновых ТГ в зависимых от инсулина подкожных адипоцитах.

Вторым этапом переноса к миоцитам ЖК является:

а) симпатическая, эфферентная активация липолиза преимущественно олеиновых ТГ в составе капель липидов в ИПА;

б) освобождение адипоцитами ЖК в форме НЭЖК и перенос их в кровотоке в ассоциации с альбумином к поперечнополосатым миоцитам;

в) поглощение ЖК скелетными, поперечнополосатыми миоцитами в форме полярных НЭЖК при действии CD36-транслоказы в условиях высокого градиента концентраций межклеточная среда: цитоплазма миоцитов [35]. Физиологично концентрация НЭЖК в цитоплазме миоцитов составляет лишь следовые количества. Активно поглощая лишь полярные НЭЖК, ни поперечнополосатые миоциты, ни кардиомиоциты не запасают ЖК в форме ТГ и не формируют капель липидов между сократительными мышечными волокнами [36].

Не запасая ЖК в форме капель липидов, все скелетные миоциты и синцитий кардиомиоцитов запасают большое количество гидрофильного гликогена – полимера глюкозы. При микроскопии более 40% площади цитоплазмы скелетных миоцитов заняты глобулами гидрофильного гликогена; после физической нагрузки содержание гликогена уменьшается на порядок. И даже при наличии генетически обусловленной патологии митохондрий, как и

у пациентов мясоедов при высоком содержании в крови экзогенной пальмитиновой НЖК [37], скелетные миоциты и кардиомиоциты формируют лишь микрокапли ТГ в форме опалесценции цитоплазмы при микроскопии [38]. Это так называемый эктопический жир [39]. На фоне такой опалесценции ЖК, если она становится постоянной, формируется дилатационная кардиомиопатия [40].

Вне сомнения, ретроспективно в филогенезе трудно проследить последовательное преобладание метаболизма ЖК в зависимости от длины цепи и числа ДС [41]; в то же время филогенетическая теория общей патологии даёт основание полагать следующее.

1. Первым на ступенях филогенеза в глубинах океана при формировании мембран соматических клеток, потомки ранних гетеротрофов архей, сформировали метаболизм длинноцепочечных ЖК; доминировали пальмитиновая НЖК и пальмитиновый вариант метаболизма С16:0 НЖК и С18:0 МЖК [42]. Все клетки синтезировали пальмитиновую НЖК по пути С2 ацетил-КоА → С16:0 пальмитиновая НЖК, без освобождения и метаболизма среднецепочечных ЖК. Далее в темноте глубин океана первичные сине-зеленые растительные клетки и соматические клетки животных стали синтезировать С20-С22 ННЖК и выражено активные ПНЖК [43].

2. Через миллионы лет в поверхностных водах океана аэробные автотрофы, которые осуществили фотосинтез глюкозы, после исторического симбиотического слияния с анаэробами археями стали прародителями всех клеток нервной ткани. Все астроциты, глиальные клетки и нейроны окисляли в митохондриях ацетил-КоА, образованный только из глюкозы, в то время как депонирование глюкозы отработано не было. *In vivo*, в порядке реализации биологической функции алаптации, биологической реакции компенсации, соматические клетки начали синтез среднецепочечных ЖК и при липолизе формировать далее С4 КТ. Только КТ могут преодолеть гидрофильную среду спинномозговой жидкости.

3. Через следующие миллионы лет океан отступил, плотоядные (рыбоядные) животные оказались на суше при обилии растительной пищи как источнике глюкозы. Вновь экспрессированный инсулин инициировал синтез клетками из экзогенной глюкозы не пальмитиновой НЖК, как это ранее реализовали соматические клетки, а синтез олеиновой МЖК. Специфичное действие инсулина осуществлено в реакциях: С16:0 пальмитиновая НЖК → С18:0 стеариновая НЖК → ω-9 С18:1 цис- олеиновая МЖК [44]. Инсулин заменил малоэффективный пальмитиновый вариант метаболизма ЖК на олеиновый высокоэффективный вариант. В экспериментах *in vitro* озон окисляет олеиновую НЖК с константой скорости реакции в 5 раз более высокой, чем пальмитиновую НЖК [45, 46].

Можно обоснованно полагать, что на самых ранних ступенях филогенеза клетки реализовали преимущественно метаболизм длинноцепочечных ЖК с преобладанием пальмитиновой НЖК. На более поздних ступенях филогенеза активирован метаболизм среднецепочечных ЖК и синтез кетонных тел как субстрата для окисления митохондриями клеток нервной ткани. На более поздних ступенях филогенеза инсулин инициировал: а) превращение плотоядных в океане предков вида *Homo sapiens* в травоядный вид на суше; б) регуляцию становления биологической функции локомоции и в) доминирование олеинового варианта метаболизма длинноцепочечных ЖК с выраженным повышением кинетических параметров организмов.

В биохимических реакциях *in vivo* на ранних ступенях филогенеза длинноцепочечная пальмитиновая НЖК доминировала в построении бислоиных мембран клеток и в качестве субстрата для окисления в митохондриях при наработке энергии. Позднее ПНЖК стали элементом построения мембран внутриклеточных органелл [47] и субстратом для синтеза биологически активных гуморальных медиаторов – эйкозаноидов. На более поздних ступенях филогенеза начат синтез среднецепочечных ЖК; это субстрат для формирования кетонных тел, единственного С4 липида, который доступен для митохондрий клеток нервной ткани; только кетонные тела могут преодолеть гидрофильную среду спинномозговой жидкости. Производные среднецепочечных ЖК стали гуморальными медиаторами метаболизма ЖК и формирования механизмов обратной связи (*feed back mechanism*) в биологической функции трофологии. Формирование при регуляторном действии инсулина олеинового варианта метаболизма ЖК привело к совершенству обеспечения клеток энергией и кинетических параметров многих видов травоядных млекопитающих, в том числе и *Homo sapiens*.

Приведённые выше семь метаболических пандемий, являются нарушениями только функциональными и могут быть, в значительной мере, устранены. С позиций филогенетической теории общей патологии мы полагаем, что ишемическая болезнь сердца, атеросклероз и атероматоз артерий большого будущего не имеют. Как только большинству особей вида Человек разумный мы в плане профилактики поможем осознать, что на ступенях филогенеза они сформировались как травоядные с плотоядным прошлым и перестанут поедать избыточное количество мясной пищи, экзогенной пальмитиновой НЖК, частота ИБС в популяции начнёт быстро снижаться. Пациенты всё-таки обязаны оправдывать биологическое, бинарное наименование вида – Человек разумный. Более детально вопросы профилактики можно обсуждать и в отношении иных метаболических пандемий, болезней цивилизации. Требуется только время, понимание происходящего врачами и большое желание самих пациентов быть здоровыми [48].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-6, 8-15, 17-33, 35-44, 47
см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. *Клиническая биохимия. Курс лекций.* М.:ИНФРА-М; 2017.
7. Уголев А.М. *Естественные технологии биологических систем.* Ленинград: Наука; 1987.
16. Дмитриев Л.Ф. С3-альдегиды и нарушение клеточного метаболизма: возможные способы нормализации углеводного обмена. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015; 2: 13 – 8.
34. Титов В.Н. *Эссенциальная метаболическая артериальная гипертония. Метаболическая АГ, патогенез и этиология.* Palmarum Academic publishing; 2016.
45. Лисицын Д.М., Разумовский С.Д., Тишинин М.А., Титов В.Н. Кинетические параметры окисления озоном индивидуальных жирных кислот. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2004; 138(11): 517 – 9.
46. Сажина Н.Н., Евтеева Н.М., Титов В.Н. Экспериментальная оценка констант скорости взаимодействия озона с индивидуальными жирными кислотами. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2018; 165(3): 331 – 5.
48. Медведев О.С., Почичкая И.М., Медведева Н.А. Трансизомеры жирных кислот и их влияние на здоровье человека. *Новости медико-биологических наук.* 2016; 14(4): 83 – 92.

REFERENCES

1. Titov V.N. *Clinical biochemistry [Klinicheskaya biokhimiya. Kurs lektsiy]*. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
2. Kalinin A., Krashennnikov V., Sviridov A., Titov V. Chemometry of clinically important fatty acids in the blood serum using near infrared spectrometer. *Am. J. Chem. Appl.* 2018; 5(3): 45–50.
3. Kuipers R.S., de Craaf D.J., Luxwolda M.F., Muskiet M.H., Dijk-Brouwer D.A., Muskiet F.A. Saturated fat, carbohydrates and cardiovascular disease. *Neth. J. Med.* 2011; 69(9): 372–8.
4. Choi H.Y., Hafiane A., Schwertani A., Genest J. High-density lipoproteins: biology, epidemiology, and clinical management. *Can. J. Cardiol.* 2017; 33(3): 325–33.
5. Ferreri C., Masi A., Sansone A., Giacometti G., Larocca A.V., Menounou G. Fatty acids in membranes as homeostatic, metabolic and nutritional biomarkers: recent advancements in analytics and diagnostics. *Diagnostics* (Basel). 2016; 7(1). pii: E1.
6. Giralt M., Villroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013; 154(9): 2992–3000.
7. Ugolev A.M. *Natural technologies of biological systems. [Estestvennye tehnologii biologicheskikh sistem]*. Leningrad: Nauka; 1987. (in Russian)
8. Yang C., Aye C.C., Li X., Diaz Ramos A., Zorzano A., Mora S. Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells. *Biosci. Rep.* 2012; 32(5): 465–78.
9. Wu D., Liu J., Pang X., Wang S., Zhao J., Zhang X., Feng L. Palmitic acid exerts pro-inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C-reactive protein, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α . *Int. J. Mol. Med.* 2014; 34(6): 1706–12.
10. Tillander V., Bjorndal B., Burri L., Bohov P., Skorve J., Berge R.K., Alexson S.E. Fish oil and krill oil supplementations differentially regulate lipid catabolic and synthetic pathways in mice. *Nutr. Metab. (Lond)*. 2014; 11: 20–8.
11. Jonsson A.L., Backhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 2017; 14(2): 79–87.
12. Knop F.K. EJE PRIZE 2018: A gut feeling about glucagon. *Eur. J. Endocrinol.* 2018; 178(6): R267–R280.
13. Toth C.C. Persistent cerebrospinal fluid abnormalities in the syndrome of headache, neurological deficit, and cerebrospinal fluid lymphocytosis despite resolution of clinical symptomatology. *Headache*. 2002; 42(10): 1038–43.
14. Misra S., Oliver N.S. Utility of ketone measurement in the prevention, diagnosis and management of diabetic ketoacidosis. *Diabet. Med.* 2015; 32(1): 14–23.
15. Newman J.C., Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends. Endocrinol. Metab.* 2014; 25(1): 42–52.
16. Dmitriev L.F. C3-aldehydes and impaired cellular metabolism: possible ways to normalize carbohydrate metabolism. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 2: 13–8. (in Russian)
17. Zhang Y., Kuang Y., LaManna J.C., Puchowicz M.A. Contribution of brain glucose and ketone bodies to oxidative metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013; 765: 365–70.
18. Calder P.C. Long chain fatty acids and gene expression in inflammation and immunity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2013; 16(4): 425–33.
19. Huang W., Metlakunta A., Dedousis N., Zhang P., Sipula I., Dube J.J. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes*. 2010; 59(2): 347–357.
20. Le Fool C., Levin B.E. Fatty acid-induced astrocyte ketone production and the control of food intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2016; 310(11): R1186–R1192.
21. Moulle V.S., Picard A., Le Foll C., Levin B.E., Magnan C. Lipid sensing in the brain and regulation of energy balance. *Diabetes. Metab.* 2014; 40(1): 29–33.
22. Migrenne S., Magnan C., Cruciani-Guglielmacci C. Fatty acid sensing and nervous control of energy homeostasis. *Diabetes. Metab.* 2007; 33(3): 177–82.
23. Thevenet J., De Marchi U., Domingo J.S., Christinat N., Bultot L. Medium-chain fatty acids inhibit mitochondrial metabolism in astrocytes promoting astrocyte-neuron lactate and ketone body shuttle systems. *FASEB J.* 2016; 30(5): 1913–26.
24. Martin D.D., Beauchamp E., Berthiaume L.G. Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. *Biochimie*. 2011; 93(1): 18–31.
25. Rioux V., Pédrono F., Legrand P. Regulation of mammalian desaturases by myristic acid: N-terminal myristoylation and other modulations. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; 1811(1): 1–8.
26. Beauchamp E., Rioux V., Legrand P. New regulatory and signal functions for myristic acid. *Med. Sci. (Paris)*. 2009; 25(1): 57–63.
27. Lemarie F., Beauchamp E., Drouin G., Legrand P., Rioux V. Dietary caprylic acid and ghrelin O-acyltransferase activity to modulate octanoylated ghrelin functions: What is new in this nutritional field? *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids*. 2018; 135: 121–7.
28. Fukumori R., Sugino T., Shingu H., Moriya N., Kobayashi H., Hasegawa Y. Ingestion of medium chain fatty acids by lactating dairy cows increases concentrations of plasma ghrelin. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2013; 45(4): 216–23.
29. Magnan C., Luguët S. Role of fatty acids in the nervous control of energy balance. *Biol. Aujourd'hui*. 2015; 209(4): 309–15.
30. Picard A., Moullé V.S., Le Foll C., Cansell C., Vêret J., Coant N. Physiological and pathophysiological implications of lipid sensing in the brain. *Diabetes. Obes. Metab.* 2014; 16 Suppl 1: 49–55.
31. Geelen M. J.H. Medium-chain fatty acids as short-term regulators of hepatic lipogenesis. *Biochem. J.* 1994; 302: 141–6.
32. Yin Y., Li Y., Zhang W. The growth hormone secretagogue receptor: its intracellular signaling and regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(3): 4837–55.
33. Nonaka Y., Takagi T., Inai M., Nishimura S., Urashima S. Lauric acid stimulates ketone body production in the KT-5 astrocyte cell line. *J. Oleo. Sci.* 2016; 65(8): 693–9.
34. Titov V.N. Essential metabolic arterial hypertension. Metabolic hypertension, pathogenesis and etiology [Essentsial'naya, metabolicheskaya arterial'naya gipertoniya. Berlin: Palmarum Academic publishing; 2016. (in Russian)
35. Bays H.E., González-Campoy J.M., Bray G.A., Kitabchi A.E., Bergman D.A. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 2008; 6(3): 343–68.
36. van Hees A.M.J., Saris W.H.M., Hul G.B., Schaper N.C., Timmerman B.E. Effects of dietary fat modification on skeletal muscle fatty acids handling in the metabolic syndrome. *Int. J. Obes.* 2010; 34: 859–70.
37. Yli-Jokipii K., Kallio H., Schwab U., Mykkänen H., Kurvinen J.P., Savolainen M.J., Tahvonen R. Effects of palm oil and transesterified palm oil on chylomicron and VLDL triacylglycerol structures and postprandial lipid response. *J. Lipid Res.* 2001; 42(10): 1618–25.
38. Daemen S., van Polanen N., Hesselink M.K.C. The effect of diet and exercise on lipid droplet dynamics in human muscle tissue. *Exp. Biol.* 2018; 221(Pt Suppl 1). pii: jeb167015.
39. Blaak E.E. Basic disturbances in skeletal muscle fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Proc. Nutr. Soc.* 2004; 63(2): 323–330.
40. Liu K., Czaja M.J. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell. Death. Differ.* 2013; 20(1): 3–11.
41. Thompson B.R., Lobo S., Bernlohr D.A. Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 318(1–2): 24–33.
42. Lee J.Y., Sohn K.H., Rhee S.H., Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(20): 16683–9.
43. de Goede J., Geleijnse J.M., Boer J.M., Kromhout D., Verschuren W.M. Marine (n-3) fatty acids, fish consumption, and the 10-year risk of fatal and nonfatal coronary heart disease in a large population of Dutch adults with low fish intake. *J. Nutr.* 2010; 140(5): 1023–8.
44. Mar-Heyming R., Miyazaki M., Weissglas-Volkov D., Kolaitis N.A., Sadaat N., Plaisier C. Association of stearoyl-CoA desaturase 1 activity with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28(6): 1193–9.
45. Lisitsyn D.M., Razumovsky S.D., Tishenin M.A., Titov V.N. Kinetic parameters of ozone oxidation of individual fatty acids. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2004; 138(11): 517–9. (in Russian)
46. Sazhina N.N., Evteeva N.M., Titov V.N. Experimental evaluation of the rate constants of the interaction of ozone with individual fatty acids. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2018; 165(3): 331–5. (in Russian)
47. Beppu F., Yasuda K., Okada A., Hirosaki Y., Okazaki M., Gotoh N. Comparison of the distribution of unsaturated fatty acids at the sn-2 position of phospholipids and triacylglycerols in marine fishes and mammals. *J. Oleo. Sci.* 2017; 66(11): 1217–27.
48. Medvedev O.S., Pochitskaya I.M., Medvedev N.A. Transisomers of fatty acids and their effects on human health. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk*. 2016; 14(4): 83–92. (in Russian)

Поступила 10.11.18

Принята к печати 25.11.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.61-02:616-006.448-085.277.3

Горошинская И.А., Франциянц Е.М., Зудерман Н.Е., Ушакова Н.Д., Погорелова Ю.А., Черярина Н.Д., Лысенко И.Б., Шульга А.В.

ПОКАЗАТЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ В ПРОЦЕССЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ, 344037, Ростов-на-Дону, Россия

Цель работы – изучение уровня маркеров острого повреждения почек цистатина С, молекулы поражения почек-1 (KIM-1), интерлейкина-18 (ИЛ-18), нейтрофил-желатиназа-ассоциированного липокалина (neutrophil gelatinase-associated lipocalin – NGAL) и L-типа белка, связывающего жирные кислоты (L-FABR), в крови и моче больных первично выявленной секретирующей множественной миеломой (ММ) до начала и в процессе химиотерапевтического лечения. Содержание почечных маркеров исследовали методом ИФА с использованием коммерческих наборов. В исследование включено 23 больных ММ, которые получали 6–8 21-дневных циклов химиотерапии (ХТ) по схеме VCD. Сопоставлены результаты в основной группе – 13 больных, которым перед каждым из циклов ХТ за сутки проводился селективный плазмообмен с использованием плазмосепаратора “Evaclio”, и в контрольной группе – 10 больных, получавших лечение без применения методов экстракорпоральной детоксикации. У больных ММ до начала лечения выявлено повышение в крови уровня ИЛ-18 в 8,6 раза, KIM-1 – в 3,1 раза, L-FABR – на 57,4% и цистатина С – на 48,4% и снижение уровня NGAL у 75% больных на 74,3% по сравнению с уровнем в группе здоровых, а в моче исходно увеличенным оказалось лишь содержание KIM-1 – в 2,4 раза и NGAL – в 2,6 раза. Проведение многокурсовой ХТ с предшествующим плазмообменом оказывало более щадящее действие на больных ММ, о чём свидетельствовал более низкий уровень KIM-1 в крови и моче после 1-го и 2-го курсов ХТ, а также ИЛ-18 в крови и моче после 1-го курса ХТ у больных основной группы по сравнению с контрольной группой. Для больных с летальным исходом характерно резкое увеличение содержания цистатина С, NGAL и L-FABR. Анализ динамики исследованных показателей почечного повреждения указывает на связь их уровня с клиническими особенностями состояния отдельных больных, успешностью и переносимостью химиотерапевтического лечения ММ.

Ключевые слова: первично выявленная секретирующая множественная миелома; маркеры повреждения почек; цистатин С; KIM-1; ИЛ-18; NGAL; L-FABR.

Для цитирования: Горошинская И.А., Франциянц Е.М., Зудерман Н.Е., Ушакова Н.Д., Погорелова Ю.А., Черярина Н.Д., Лысенко И.Б., Шульга А.В. Показатели повреждения почек у больных множественной миеломой в процессе химиотерапевтического лечения. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (12): 741-749.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-741-749>

Goroshinskaya I.A., Franzintz E.M., Zuderman N.E., Ushakova N.D., Pogorelova Yu.A., Cheryarina N.D., Lysenko I.B., Shulga A.V.
INDICATORS OF KIDNEY DAMAGE IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA IN THE PROCESS OF CHEMOTHERAPEUTIC TREATMENT

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

The purpose was to study the level of acute kidney injury markers cystatin C, KIM-1, IL-18, NGAL and L-FABR in the blood and urine of patients with the initially identified secreting multiple myeloma (MM) before and during chemotherapeutic treatment. The content of renal markers was examined by ELISA using commercial kits. The study included 23 patients with MM who received 6-8 21-day cycles of chemotherapy (CT) according to the VCD scheme. The results were compared in the main group of 13 patients who had a selective plasma exchange a day before each of the cycles of HT with the use of the Evaclio plasma separator and in a control group of 10 patients treated without extracorporeal detoxification. MM patients before treatment showed an increase in blood IL-18 level of 8.6 times, KIM-1 - 3.1 times, L-FABR - 57.4%, cystatin C - 48.4% and also a decrease in the level of NGAL in 75% of patients by 74.3% compared to the level in healthy, while in the urine initially increased only KIM-1 content by 2.4 times and NGAL by 2.6 times. Conducting multi-course chemotherapy with previous plasma exchange had a more lenient effect on MM patients, as evidenced by a lower KIM-1 level in blood and urine after 1 and 2 courses of HT, as well as IL-18 in blood and urine after 1 course of HT in patients of primary group compared with the control group. For patients with a fatal outcome, a sharp increase in the levels of cystatin C, NGAL and L-FABR is characteristic. The analysis of the dynamics of the studied markers of renal damage indicates the correlation of their level with the clinical features of individual patients, the success and tolerability of chemotherapeutic treatment of MM.

Key words: primarily revealed secreting multiple myeloma; markers of kidney damage; cystatin C; KIM-1; IL-18; NGAL; L-FABR.

For citation: Goroshinskaya I.A., Franzintz E.M., Zuderman N.E., Ushakova N.D., Pogorelova Yu.A., Cheryarina N.D., Lysenko I.B., Shulga A.V. Indicators of kidney damage in patients with multiple myeloma in the process of chemotherapeutic treatment. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63(12): 741-749 (in Russ.).
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-741-749>

For correspondence: Goroshinskaya I.A., Sc.D., professor, principal researcher of the laboratory of studies of the pathogenesis of malignant tumors; e-mail: iagor17@mail.ru

Information about authors:

Goroshinskaya I.A., <http://orcid.org/0000-0001-6265-8500>

Franzintz E.M., <http://orcid.org/0000-0002-5191-1758>

Zuderman N.E., <http://orcid.org/0000-0002-2651-2106>

Ushakova N.D., <http://orcid.org/0000-0002-0068-0881>

Pogorelova Yu.A., <http://orcid.org/0000-0002-2674-9832>

Lysenko I.B., <http://orcid.org/0000-0003-4457-3815>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 16.07.2018
Accepted 10.12.2018

В настоящее время отмечается неуклонное увеличение числа онкологических больных с хронической почечной недостаточностью (ХПН). При этом ХПН может быть как самостоятельной патологией, так и связанной с основным заболеванием, как, например, при множественной миеломе (ММ), или может быть обусловлена предшествующим лечением с применением нефротоксичных противоопухолевых препаратов [1–3].

Патология почек наблюдается более чем у половины больных ММ. Миеломная нефропатия (cast nephropathy) – поражение почек при ММ – может быть обусловлена нефротоксичностью лёгких цепей иммуноглобулинов, гиперкальциемией, гиперурикемией и отложением аномального парапротеина [4–6]. Острое и особенно хроническое заболевание почек является основной клинической характеристикой пациентов с ММ [7–9]. Согласно данным, представленным в обзоре D. Katagiri и соавт. [7] у пациентов с ХПН заболеваемость ММ и смертность после лечения выше, чем у пациентов с нормальной функцией почек. Сочетание химиотерапевтического лечения и гемодиализа приводило к устойчивому снижению концентрации свободных лёгких цепей моноклонального иммуноглобулина в крови большинства пациентов.

Актуальным остаётся поиск новых мочевых маркёров, имеющих высокую чувствительность и специфичность для ранней диагностики острого повреждения почек (ОПП), мониторинга ХПН, оценки их тяжести, а также изучение информативности использования маркёров у онкологических больных. Особое внимание уделяется маркёрам раннего повреждения почек, которые представлены специфическими белками, продуцируемыми в канальцевом аппарате почек, и при развитии острого повреждения в повышенном количестве выделяются в кровь и мочу. К ним относятся нейтрофил-желатиназа-ассоциированный липокалин (neutrophil gelatinase-associated lipocalin – NGAL), молекула поражения почек-1 (KIM-1), цитокины и хемокины, в том числе интерлейкин-18 (ИЛ-18), L-тип белка, связывающий жирные кислоты (L-FABR), и ряд других белков [10–12]. К маркёрам ОПП относят также белки с низкой молекулярной массой, в том числе цистатин С, обладающий рядом преимуществ для оценки функции почек. Это цистеиновый ингибитор протеаз с мол. массой 13 400 Da, который синтезируется всеми содержащими ядра клетками организма. В отличие от креатинина его продукция в меньшей степени зависит от мышечной массы, пола, возраста, антропометрических данных. Уровень цистатина С в крови обратно пропорционален скорости клубочковой фильтрации (СКФ). Разработан

ряд формул, позволяющих точнее оценивать СКФ по уровню цистатина С в крови, чем по уровню креатинина. При ОПП уровень цистатина С сыворотки повышается значительно раньше, чем уровень креатинина, а его повышенная экскреция отражает тяжесть поражения канальцев [13, 14].

Цель данной работы – изучение уровня маркёров ОПП цистатина С, KIM-1, ИЛ-18, NGAL и L-FABR в крови и моче больных первично выявленной секреторирующей ММ до начала лечения и в процессе химиотерапии (ХТ) с предшествующим селективным плазмообменом (основная группа) и без него (контрольная группа).

Материал и методы. Проведение данного научного исследования одобрено этическим комитетом ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский институт» Минздрава России (протокол №24 от 27.11.2015). В исследование включено 23 больных первично выявленной секреторирующей ММ (11 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 47 до 69 лет (средний возраст $59,7 \pm 2,2$ года), проходивших лечение в ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России в 2015–2017 гг.

У всех больных диагностировали II–III стадии миеломной болезни. Диагноз был установлен на основании данных клинического обследования, спиральной рентгеновской компьютерной томографии (СРКТ) органов грудной клетки, брюшной полости, малого таза, головного мозга; электрофореза белков сыворотки крови; миелограммы. Больные получали 6–8 21-дневных циклов лекарственного противоопухолевого лечения по схеме VCD (бортезомиб, циклофосфамид, дексаметазон). Все больные случайным образом были разделены на две группы: 1-ю (основную) составили 13 больных, комплекс лечения которых включал селективный плазмообмен (СПО); во 2-ю (контрольную) группу вошли 10 больных, лечение которых проводили без применения методов экстракорпоральной детоксикации. Группы по полу, возрасту, стадии онкологического процесса, наличию сопутствующих соматических заболеваний были однородны. СПО выполняли за сутки перед проведением каждого из циклов курса ХТ аппаратом для проведения фильтрационных экстракорпоральных методов детоксикации (мультифильтрат, «Фрезениус», Германия) с использованием систем магистралей и плазмосепаратора Evaclio EC-2C20 со скоростью перфузии 120 мл/мин. Объём плазмозамещения составлял 10 л. Плазмозамещение осуществляли 7% альбуминсодержащим плазмозамещающим раствором MultiLac (Фрезениус, Германия) 10 л + альбумин 20% – 600 мл).

Нами изучен уровень цистатина С, NGAL, L-FABR,

КИМ-1, ИЛ-18 в крови и моче больных ММ до начала лечения и в процессе химиотерапевтического лечения в основной и контрольной группах. Для сравнения использовали аналогичные показатели в крови 10–18 и в моче 21 условно здоровых доноров без диагностированного опухолевого процесса и выраженной соматической патологии, сравнимых по возрасту с больными изучаемых групп. Содержание маркеров ОПП исследовали методом ИФА с использованием коммерческих наборов: Цистатин С – Bio Vendor, Чехия; Липокалин 2/NGAL – BCM Diagnostics, США; L-FABP – Hycult biotech, Нидерланды; ИЛ-18 – Bender Medsystems, США; TIM-1/КИМ-1 – BCM Diagnostics, США на иммуноферментном анализаторе Infinite F50 TECAN (Австрия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Statistika 6.0 по *t*-критерию Стьюдента для двух независимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ – $p = 0,000000$, а при $0,1 > p > 0,05$ – на уровне статистической тенденции.

Результаты. У больных ММ уровень большей части изученных показателей раннего повреждения почек был статистически значимо выше, чем у здоровых. Наибольшее увеличение было характерно для уровня провоспалительного цитокина ИЛ-18 в крови – в 8,6 раза у больных ММ до начала лечения и возрастало в процессе химиотерапевтического лечения как в основной, так и в контрольной группах больных (табл. 1).

Однако динамика и степень увеличения различались в основной группе, в которой перед 1-м курсом химиотерапии проводился СПО, и в контрольной группе (без

СПО). У больных основной группы после СПО уровень ИЛ-18 превышал значение в группе здоровых в 5,6 раза ($p < 0,001$), после 1-го курса ХТ – в 12,2 раз, после 2-го курса ХТ – в 29,9 раза, после 4-го курса – в 80,4 раза ($p < 0,0001$). У больных контрольной группы уровень ИЛ-18 в крови превысил значение у здоровых перед 1-м курсом ХТ в 11 раз, после 1-го курса ХТ – в 77,4 раза, после 2-го курса ХТ – в 37 раз ($p < 0,00001$), после 4-го курса – в 50,5 раза ($p < 0,001$). По сравнению со средним значением до начала лечения уровень ИЛ-18 в крови больных основной группы значимо не изменялся после СПО и 1-го курса ХТ. После 2-го и 4-го курсов ХТ наблюдалось увеличение уровня данного показателя соответственно в 3,9 ($p < 0,01$) и 10,5 ($p < 0,001$) раза относительно среднего значения до начала лечения и в 5,3 ($p = 0,01$) и 14,3 ($p < 0,002$) раза относительно значения после СПО. В контрольной группе 10-кратное ($p < 0,001$) увеличение уровня ИЛ-18 в крови имело место уже после 1-го курса ХТ, после 2-го и 4-го курсов ХТ увеличение составляло 4,8 ($p = 0,00001$) и 6,6 раза ($p < 0,01$) относительно среднего значения до начала лечения. При этом уровень ИЛ-18 в крови после 1-го курса ХТ в контрольной группе был значимо выше – в 6,3 раза ($p < 0,001$), чем в основной группе больных.

В отличие от крови уровень ИЛ-18 в моче больных основной группы не претерпевал значимых изменений в результате СПО и сразу после 1-го курса ХТ, а перед началом 2-го курса ХТ зафиксировано даже его снижение в 4,5 раза относительно значения у здоровых ($p = 0,00001$) и в 4,1 раза относительно среднего значения у больных ММ до начала лечения ($p < 0,02$). После 2-го и 4-го курсов

Таблица 1

Уровень интерлейкина-18 в крови и моче больных множественной миеломой в процессе химиотерапевтического лечения

Группа	Уровень ИЛ-18 в крови, пг/мл		Уровень ИЛ-18 в моче, пг/мл	
	основная группа	контрольная группа	основная группа	контрольная группа
Здоровые	32,7 ± 4,1 (n = 15)		18,83 ± 1,38 (n = 21)	
Больные ММ: до начала лечения	280,6 ± 35,5 (n = 15) $p = 0,000005$		18,80 ± 2,69 (n = 17)	
до СПО	188,3 ± 53,2 (7) $p = 0,000313$	-	14,09 ± 4,72 (7)	-
после СПО	-	-	-	-
перед 1-м курсом ХТ	184,4 ± 50,1 (7) $p = 0,000223$	361,4 ± 24,6 (8) $p = 0,000000$	20,66 ± 4,61 (7)	22,1 ± 2,93 (10)
после 1-го курса ХТ	400,0 ± 88,8 (12) $p = 0,000095$	2530,5 ± 694,8 (6) $p = 0,000011$ $p_{\phi} = 0,000042$ $p_{ок} = 0,000522$	17,13 ± 3,96 (6)	45,25 ± 11,95 (8) $p = 0,001538$ $p_{\phi} = 0,006966$ $p_1 = 0,053458$ $p_{ок} = 0,073617$
перед 2-м курсом ХТ	447,7 ± 101,2 (8) $p = 0,0000011$ $p_{\phi} = 0,069880$ $p_2 = 0,044284$	-	4,23 ± 1,06 (6) $p = 0,000011$ $p_{\phi} = 0,004963$	-
после 2-го курса ХТ	977,5 ± 244,9 (8) $p = 0,000024$ $p_{\phi} = 0,000968$ $p_2 = 0,010861$	1208,3 ± 174,4 (8) $p = 0,000000$ $p_{\phi} = 0,000001$	23,97 ± 5,17 (6)	14,44 ± 1,91 (10) $p = 0,076666$
после 4-го курса ХТ	2629,4 ± 584,8 (8) $p = 0,000004$ $p_{\phi} = 0,000015$ $p_2 = 0,001891$	1650,1 ± 551,7 (8) $p = 0,000512$ $p_{\phi} = 0,002426$	26,63 ± 7,01 (8)	23,23 ± 8,72 (8)

Примечание. Здесь и в табл. 2–5 приведена статистическая значимость различий: p – по сравнению с донорами; p_{ϕ} – по сравнению с объединённой группой больных до начала лечения; p_1 – по сравнению со значениями до начала лечения в данной группе больных; p_2 – по сравнению со значениями после СПО; $p_{ок}$ – по сравнению с основной группой. Указаны p только для статистически значимых различий или имеющих статистическую тенденцию к значимости. В скобках указано количество больных, у которых был определен показатель.

ХТ уровень маркера не отличался от значений до начала лечения и в группе здоровых. В отличие от этого в моче больных контрольной группы наблюдалось повышение уровня ИЛ-18 после 1-го курса ХТ в 2,4 раза относительно среднего значения до начала лечения и в группе здоровых ($p < 0,01$), и он превышал уровень у больных основной группы в 2,6 раза ($0,05 < p < 0,1$).

Уровень цистатина С (ингибитора эндогенной цистеиновой протеиназы) изменялся в гораздо меньшей степени, чем уровень ИЛ-18. Этот показатель в крови больных ММ был статистически значимо выше по сравнению со значением у здоровых как до начала лечения – в среднем на 48,4% ($p < 0,0001$), так и в обеих группах больных на всех сроках лечения. В основной группе превышение составило после СПО 41,4% ($p < 0,0001$), после 1-го курса ХТ – 55,9% ($p < 0,0001$), после 2-го курса ХТ – 46,6% ($p < 0,001$). В контрольной группе повышение уровня цистатина С было несколько более выраженным: после 1-го курса ХТ – 73% ($p < 0,02$), после 2-го курса – 99,4% ($p < 0,001$) и после 4-го курса – 31% ($p < 0,05$). В моче значимых изменений уровня цистатина относительно такового у здоровых не наблюдалось ни на одном этапе лечения в обеих группах больных, за исключением крайне низких значений после 4-го курса ХТ в моче у всех больных контрольной группы – в 6,4 раза ниже нормы (табл. 2).

Относительно средних значений до начала лечения уровень цистатина С в крови и моче статистически значимо не изменялся при СПО и в процессе химиотерапевтического лечения за исключением 5-кратного снижения после 4-го курса в моче в контрольной группе.

Интерес представляют высокие значения данного показателя, наблюдавшиеся у впоследствии умерших больных, для которых изначально было характерно поражение почек, явившееся осложнением ММ. Так, у больного И. из контрольной группы уровень цистатина С в крови после 1-го и 2-го курсов ХТ превысил фоновое значение в 2,11–2,12 раза и был выше среднего значения для всех остальных больных до начала лечения в 2,25–2,26 раза. В моче больного И. высокие значения цистатина С отмечались на протяжении всего периода наблюдения и превосходили среднее значение до начала лечения у остальных больных: перед 1-м курсом ХТ в 4,8 раза, после 1-го курса ХТ в 2,6 раза, после 2-го курса

ХТ в 7,1 раза. У больного Ш. из основной группы, умершего через 10 дней после завершения 2-го курса ХТ, повышение уровня цистатина С в крови на 46,5% отмечено сразу после 1-го курса ХТ, затем перед началом 2-го курса наблюдалось двукратное повышение с последующей нормализацией сразу после окончания 2-го курса ХТ. В моче уровень данного маркера превысил фоновый на 36,8% после 1-го курса ХТ и в 6,4 раза после 2-го курса. Для сравнения можно сопоставить динамику уровня цистатина С у больной М., которой несмотря на наличие сопутствующих заболеваний (артериальная гипертензия, нарушение ритма сердца, лимфостаз нижних конечностей) были успешно проведены 4 курса ХТ, после которых наблюдалась полная ремиссия и больной была произведена аутотрансплантация стволовых клеток. В крови данной больной уровень цистатина С после СПО и 1-го курса ХТ был ниже исходных средних значений у больных ММ, приблизился к нему после 2-го курса ХТ и вновь снизился к 3-му курсу ХТ, а в моче изначально и после селективного плазмообмена был снижен более чем в 2 раза, увеличился на 43,5–53,1% после 1-го и 2-го курсов ХТ относительно исходных средних значений у больных ММ и затем вернулся к низкому уровню, характерному для этой больной до начала лечения.

Показатель КИМ-1 (табл. 3) в крови больных ММ до начала лечения превышал значение в группе здоровых в 3,1 раза ($p = 0,004$), а в моче – в 2,4 раза ($p = 0,02$).

В основной группе больных значения КИМ-1 как в крови, так и в моче после СПО и в процессе первых двух курсов ХТ находились на сравнительно более низком уровне. В крови перед ХТ и после 1-го курса наблюдалась лишь тенденция к повышению данного показателя относительно группы здоровых на 77,9–92,9% ($0,05 < p < 0,1$) с полной нормализацией после 2-го курса ХТ. И только после 4-го курса ХТ наблюдалось резкое повышение уровня КИМ-1 в основной группе – в 21 раз ($p < 0,01$) относительно значения в группе здоровых и в 6,7 раза ($p = 0,055$) по сравнению со значением до начала лечения. При этом в моче больных основной группы повышение уровня КИМ-1 до 3-го курса оказалось статистически незначимым относительно группы здоровых и лишь после 4-го курса ХТ наблюдалось резкое увеличение показателя – в 4,6 раза относительно здоровых ($p < 0,0001$) и тенденция к повышению относительно фона

Таблица 2

Уровень цистатина С в крови и моче больных множественной миеломой в процессе химиотерапевтического лечения

Группа	Уровень цистатина С в крови, нг/мл		Уровень цистатина С в моче, нг/мл	
	основная группа	контрольная группа	основная группа	контрольная группа
Здоровые	971,7 ± 30,5 (16)		1058,7 ± 187,6 (21)	
Больные ММ: до начала лечения	1441,9 ± 112,4 (9) $p = 0,000038$		851,1 ± 217,7 (9)	
до СПО	1359,8 ± 142,3(6) $p = 0,000744$	-	743,4 ± 178,2 (6)	-
после СПО	-	-	-	-
перед 1-м курсом ХТ	1373,6 ± 105,0 (6) $p = 0,000062$	1606,1 ± 173,6(3) $p = 0,000005$	833,5 ± 156,8 (7)	1823,0 ± 871,6(4)
после 1-го курса ХТ	1515,2 ± 166,0 (6) $p = 0,000076$	1681,1 ± 533,0(4) $p = 0,011231$	1136,9 ± 288,7 (4)	1097,0 ± 450,7(4)
после 2-го курса ХТ	1424,8 ± 154,3 (3) $p = 0,000133$	1937,3 ± 442,9(4) $p = 0,000240$	5179,2 ± 3875,8(2) $p = 0,001019$	2023,3 ± 1362,7(4)
после 4-го курса ХТ	-	1273,4 ± 267,0(3) $p = 0,025405$	-	165,8 ± 109,2 (3) $p = 0,092095$

Уровень молекулы почечного повреждения-1 (KIM-1) в крови и моче больных множественной миеломой в процессе химиотерапевтического лечения

Группа	Уровень KIM-1 в крови, нг/мл		Уровень KIM-1 в моче, нг/мл	
	основная группа	контрольная группа	основная группа	контрольная группа
Здоровые	0,113 ± 0,028 (18)		0,954 ± 0,243 (21)	
Больные ММ: до начала лечения	0,352 ± 0,087 (11) $p = 0,004092$		2,26 ± 0,571 (12) $p = 0,020584$	
до СПО	0,214 ± 0,056 (7) $p = 0,084471$	-	1,803 ± 0,794 (7)	-
после СПО	-	-	-	-
перед 1-м курсом ХТ	0,201 ± 0,044 (7)	0,593 ± 0,168 (4) $p = 0,000053$ $p_{ок} = 0,017971$	1,931 ± 0,809 (7)	2,90 ± 0,807 (5) $p = 0,004709$
после 1-го курса ХТ	0,218 ± 0,050 (6) $p = 0,073310$	0,468 ± 0,246 (4) $p = 0,008350$	1,205 ± 0,374 (4)	3,70 ± 0,748 (4) $p = 0,000267$ $p_{ок} = 0,024548$
ММ перед 2-м курсом ХТ	0,265 ± 0,063 (4) $p = 0,031798$	-	0,763 ± 0,468 (3)	-
после 2-го курса ХТ	0,125 ± 0,026 (4)	0,956 ± 0,367 (5) $p = 0,000211$ $p_{ок} = 0,086057$	1,625 ± 0,401 (4)	3,540 ± 0,785 (5) $p = 0,000336$ $p_{ок} = 0,085602$
после 4-го курса ХТ	2,37 ± 1,686 (4) $p = 0,005449$ $p_{ф} = 0,055006$	0,675 ± 0,224 (4) $p = 0,000075$	4,40 ± 1,139 (4) $p = 0,000083$ $p_{ф} = 0,091521$	4,10 ± 0,799 (4) $p = 0,000067$

до начала лечения ($0,05 < p < 0,1$). В контрольной группе больных уровень KIM-1 в крови и моче статистически значимо превышал соответствующие значения у здоровых: в крови после 1-го курса ХТ в 4,1 раза ($p < 0,01$), после 2-го курса в 8,5 раза ($p < 0,001$), после 4-го курса в 6 раз ($p < 0,0001$); в моче после 1-го курса ХТ в 3,9 раза ($p < 0,001$), после 2-го курса в 3,7 раза ($p < 0,001$) и после 4-го курса ХТ в 4,3 раза ($p < 0,0001$). По сравнению с основной группой уровень KIM-1 в крови больных контрольной группы был выше перед 1-м курсом ХТ в 3 раза ($p < 0,02$), после 1-го курса – в 2,1 раза, после 2-го курса – в 7,6 раза ($0,05 < p < 0,1$), а в моче в контрольной группе превышение составило после 1-го курса ХТ 3,1 раза ($p < 0,05$), после 2-го курса 2,2 раза ($0,05 < p < 0,1$).

Концентрация липокалина-2 (NGAL) в крови обследованных больных оказалась очень вариабельной, минимальные и максимальные значения до начала лечения различались в 38 раз. У больных с летальным исходом наблюдался очень высокий уровень в крови, что заставило разделить больных на две подгруппы (табл. 4). До начала лечения у пяти умерших впоследствии больных, у которых изначально наблюдались признаки поражения почек, средний уровень NGAL в крови был в 6,4 раза выше, чем у остальных 15 больных. Различия были статистически высоко значимы ($p = 0,000000$).

У больных, успешно прошедших химиотерапевтическое лечение, уровень NGAL в крови был значимо ниже, чем в группе здоровых. До начала лечения это снижение составляло в основной группе у большинства больных (без учёта впоследствии умерших) в среднем 68,7% ($p < 0,001$), а в контрольной группе – 79,2% ($p < 0,0001$). Сниженный уровень NGAL в крови относительно такового у группы здоровых наблюдался в обеих группах больных на протяжении всех курсов ХТ ($p < 0,01$ – $0,0001$). Исключение составили умершие впоследствии больные (подгруппа 2), у которых уровень NGAL в крови находился в диапазоне 2,0–7,9 нг/мл до и после 1-го и после 2-го курса ХТ. Интересно, что после 4-го курса ХТ

у всех больных основной группы независимо от исхода заболевания зафиксирован низкий уровень NGAL – почти в 3 раза ниже, чем в группе доноров ($p < 0,001$).

Показано отсутствие статистически значимого изменения NGAL в крови больных основной группы в процессе ХТ по сравнению со значениями до лечения. В моче больных этой группы уровень NGAL значимо снижался только после 1-го курса ХТ – на 73,7% ($p = 0,058$). Проведение СПО не оказывало влияния на уровень показателя в крови и моче.

У больных контрольной группы наблюдалась тенденция к постепенному нарастанию уровня NGAL в крови в процессе химиотерапевтического лечения и после 4-го курса ХТ отмечено статистически значимое увеличение показателя на 127,4% ($p = 0,01$). В моче больных контрольной группы значимые изменения отсутствовали.

Показатель L-FABR, представляющий собой L-тип белка, связывающий жирные кислоты, в крови больных ММ до начала лечения был выше, чем в группе здоровых, на 57,4% ($p < 0,05$) и изменялся незначительно в процессе химиотерапевтического лечения. Статистически значимое превышение уровня у здоровых наблюдалось в основной группе только после СПО – на 88,4% ($p = 0,055$) и перед 2-м курсом ХТ – на 57,5% ($p < 0,05$), а в контрольной группе – после 1-го курса ХТ – на 84,7%. При этом в основной группе значимого увеличения уровня данного маркера после 1-го курса ХТ не наблюдалось. В табл. 5 представлены средние значения L-FABR по обследованным группам, из которых были исключены резко отличающиеся данные, полученные у больных, описанных ниже.

В моче больных ММ не выявлено значимых отличий концентрации L-FABR от таковой в группе здоровых за исключением резкого снижения у большинства больных основной группы после 2-го курса ХТ (в 11,7 раз, $p < 0,05$) и тенденции к повышению в контрольной группе больных после 1-го курса ХТ в среднем в 2,2 раза ($p = 0,057$).

Индивидуальный анализ также не выявил значи-

Уровень липокалина-2 (NGAL) в крови и моче больных множественной миеломой в процессе химиотерапевтического лечения

Группа	Уровень NGAL в крови, нг/мл		Уровень NGAL в моче, нг/мл	
	основная группа	контрольная группа	основная группа	контрольная группа
Здоровые	3,06 ± 0,393 (10)		0,163 ± 0,025 (8)	
Больные ММ: до начала лечения	1,84 ± 0,471 (20) 1) 0,787 ± 0,13 (15) <i>p</i> = 0,000002 2) 5,00 ± 0,84 (5) <i>p</i> = 0,031400		0,426 ± 0,125 (19)	
до СПО	2,643 ± 0,697 (12) 1) 0,959 ± 0,24 (7) <i>p</i> = 0,000972 2) 5,00 ± 0,84 (5) <i>p</i> = 0,031400		0,586 ± 0,201(11) <i>p</i> = 0,094159	
после СПО	1,765 ± 0,506 (12) <i>p</i> = 0,064359		-	
перед 1-м курсом ХТ	1) 0,773 ± 0,217(8) <i>p</i> = 0,000221 2) 3,75 ± 0,793 (4)		0,368 ± 0,137(10) 0,206 ± 0,066 (8)	
после 1-го курса ХТ	1,833 ± 0,392 (12) <i>p</i> = 0,040543 1) 0,957 ± 0,208 (7) <i>p</i> = 0,000823 2) 3,06 ± 0,53 (5)		0,888 ± 0,209 (9) <i>p</i> = 0,000198 0,154 ± 0,035(10) <i>p</i> ₁ = 0,058182 0,247 ± 0,095 (8)	
после 2-го курса ХТ	2,456 ± 0,689 (10) 1) 1,423 ± 0,248 (7) <i>p</i> = 0,006367 2) 4,867 ± 1,594(3)		0,949 ± 0,171(10) <i>p</i> = 0,000110 0,478 ± 0,130(11) <i>p</i> = 0,058761 0,497 ± 0,202(10) 1) 0,248 ± 0,084(8) 2) 1,495 ± 0,625(2)	
после 4-го курса ХТ	1,122 ± 0,16 (9) <i>p</i> = 0,000405		1,446 ± 0,239 (9) <i>p</i> = 0,003310 0,747 ± 0,289 (9) <i>p</i> = 0,077489 1) 0,366 ± 0,16(7) 2) 2,08 ± 0,42 (2) 0,42 ± 0,265 (7) 1) 0,157 ± 0,038(6) 2) 2,0 (1)	

мых изменений уровня L-FABR в процессе химиотерапевтического лечения в крови и моче большинства обследованных больных как основной, так и контрольной группы. СПО также не изменял уровень L-FABR у большинства больных. Однако следует отметить большой индивидуальный разброс значений данного показателя.

Так, для больной Н. основной группы был характерен изначально очень высокий уровень L-FABR в крови (выше, чем у остальных больных, в 4,5 раза, а по сравнению со здоровыми – в 7,1 раза) и особенно в моче (более чем на порядок: по сравнению с другими больными – в 15 раз до СПО и в 19 раз после СПО, а по сравнению со здоровыми – в 11,3–13,6 раза). После 4-го курса ХТ уровень L-FABR в моче снизился в 15,3 раза по сравнению с исходным, не отличался от такового у здоровых, но оставался выше, чем у остальных больных основной группы, обследованных после 4-курсового химиотерапевтического лечения. При этом в крови у данной больной после 4-го курса ХТ зафиксирован очень высокий уровень L-FABR, который в 8,3 раза превышал среднее значение для остальных больных и на 26,9% её исходное значение, был выше среднего по группе здоровых в 9 раз. У данной больной G-миелома, стадия IIA, клиническая группа 2, хронический вирусный гепатит С, артериальная гипертония I стадии, гипотиреоз. Результаты анализов крови и мочи больной Н. свидетельствовали об увеличении содержания общего белка в моче после окончания 4-го курса ХТ. При исследовании показателей свободнорадикального окисления у больной Н. было выявлено резкое повышение уровня малонового диальдегида (МДА) в плазме крови – в 4,7 раза относительно

его значения до начала лечения и в 8,7 раза относительно уровня у доноров.

Высокие значения L-FABR выявлены также в крови больного Ш. основной группы, умершего через 10 дней после завершения 2-го курса ХТ: в 2–3 раза выше, чем у большинства больных до и после СПО и после 2-го курса ХТ. Уровень L-FABR в крови больного Ш. превышал таковой в группе здоровых в 2,5–4,5 раза. В моче данного больного наблюдали повышение уровня L-FABR после 1-го курса ХТ в 6,5 раза и после 2-го курса ХТ в 29,4 раза по сравнению с его исходным значением (перед проведением СПО), что по сравнению с группой здоровых составляло превышение в 5,1 и 23,3 раза соответственно. У больного И. контрольной группы, умершего после проведения шести курсов ХТ, уровень L-FABR в моче перед началом лечения составил 3738,6 пг/мл, превосходя среднее значение у остальных больных (за исключением больной Н.) в 16,2 раза.

Обсуждение. В результате проведённых исследований установлено, что больные основной и контрольной групп после 1-го курса ХТ существенно различались по уровню ИЛ-18 как в крови, так и в моче. Только у больных контрольной группы наблюдалось резкое повышение уровня данного цитокина после начала химиотерапевтического лечения, и он статистически значимо превышал уровень у больных основной группы после 1-го курса ХТ. После 2-го и 4-го курсов ХТ статистически значимых различий между больными основной и контрольной групп не выявлено ни по показателям в крови, ни по показателям в моче.

В одном из экспериментальных исследований была продемонстрирована роль провоспалительного цитоки-

Уровень L-FABR в крови и моче больных множественной миеломой в процессе химиотерапевтического лечения

Группа	Уровень L-FABR в крови, пг/мл		Уровень L-FABR в моче, пг/мл	
	основная группа	контрольная группа	основная группа	контрольная группа
Здоровые	420,4 ± 41,9 (14)		304,5 ± 56,9 (21)	
Больные ММ: до начала лечения	661,5 ± 107,2 (10) <i>p</i> = 0,028355		221,7 ± 41,9 (10)	
до СПО	719,9 ± 167,3 (6) <i>p</i> = 0,026436	-	230,8 ± 38,2 (6)	-
после СПО	791,9 ± 292,6 (5) <i>p</i> = 0,054822	-	219,4 ± 83,3 (6)	-
перед 1-м курсом ХТ		573,8 ± 109,2 (4)		208,1 ± 96,9 (4)
после 1-го курса ХТ	521,4 ± 148,7 (5)	776,3 ± 269,8 (4) <i>p</i> = 0,035369	292,6 ± 39,7 (4)	683,5 ± 342,5 (4) <i>p</i> = 0,057142
перед 2-м курсом ХТ	662,1 ± 83,6 (3) <i>p</i> = 0,027279	-	84,5 ± 34,8 (3)	-
после 2-го курса ХТ	621,7 ± 246,1 (3)	496,1 ± 60,7 (5)	26,05 ± 7,94 (4) <i>p</i> = 0,046987 <i>p_φ</i> = 0,013889 <i>p₁</i> = 0,002795	180,0 ± 93,6 (5)
после 4-го курса ХТ	459,0 ± 95,3 (3)	640,1 ± 241,9 (4)	108,3 ± 44,2 (4)	90,6 ± 61,2 (4)

на ИЛ-18 в реакции повреждения канальцевого эпителия [15]. Считается, что динамика уровня ИЛ-18 может иметь прогностическое значение в отношении продолжительности ОПП и сроков восстановления почечной функции. Цитокин ИЛ-18 вырабатывается проксимальным трубчатый эпителием после действия нефротоксических факторов. Определение ИЛ-18 в моче позволяет идентифицировать на самой ранней стадии почечное повреждение, вызванное ишемией, и является не только маркером ОПП, но и предиктором летальности у больных в критическом состоянии [16]. Показано, что ИЛ-18 может обладать низкой чувствительностью, но высокой специфичностью: у некоторых больных с ОПП концентрация маркера может оставаться в пределах нормы, но увеличение концентрации с большей степенью достоверности свидетельствует об ОПП [17]. Полученные нами данные позволяют предположить, что уровень данного цитокина у больных ММ может явиться прогностическим фактором переносимости химиотерапии, что требует дальнейших исследований на большем контингенте пациентов.

Анализ уровня цистатина С в среднем в основной и контрольной группах и особенно сопоставление индивидуальной динамики данного показателя у отдельных больных, различающихся по течению процесса и эффективности проводимого лечения, позволяет прийти к заключению о значимости уровня цистатина С, особенно в моче, как дополнительного критерия прогноза успешности лечения и летальности больных ММ с нарушением работы почек. Определение концентрации цистатина С относят к современным методам лабораторной диагностики, позволяющим выявить почечную патологию на ранней стадии [18].

КИМ-1 является липопротеином, который участвует в клеточном взаимодействии. При остром повреждении почек разного генеза его концентрация увеличивается в проксимальных отделах нефрона [15]. По нашим данным, у всех обследованных пациентов ещё до начала лечения наблюдалось резкое повышение уровня КИМ-1 как в крови, так и в моче в среднем в 3 и почти в 2,5 раза. Это позволяет думать о наличии повреждения почек у большинства больных ММ, вошедших в наше исследо-

вание. Дальнейшая динамика уровня КИМ-1 зависела от варианта лечения. У больных, которым проводился СПО, уровень КИМ-1 на первых двух курсах ХТ был статистически значимо ниже, чем без СПО. При раке почки только у больных при исходно диагностированной в предоперационном периоде хронической болезни почек выявлено почти двукратное повышение уровня КИМ-1 в крови, а также цистатина С, ИЛ-18 в крови и L-FABR в крови и моче [19], а также показана зависимость этих маркеров от состояния больных и выбора анестезии [20, 21].

Показатель NGAL (липокалин-2) рассматривается как один из наиболее информативных маркеров ОПП, отражающих активность процессов почечной фильтрации и реабсорбции [12]. Его относят к белкам острой фазы воспалительного ответа, и в крови уровень NGAL характеризует начальные этапы повреждения клеток клубочка [22, 23]. Увеличение плазменного уровня может иметь место только при повреждении проксимальных канальцев почки, ведущем к снижению реабсорбции NGAL и, что важнее, к увеличению его синтеза в клетках канальцев [24]. При этом уровни в моче и плазме коррелируют только в том случае, если синтез NGAL повышен. Встречаются также исследования, в которых уровень NGAL при почечной патологии не отличался от такового в группе контроля [25].

Согласно полученным нами данным у большинства больных ММ до начала лечения содержание NGAL в крови значительно ниже нормы, что позволяет предположить снижение его синтеза. При этом выявлена зависимость уровня NGAL в крови от состояния больных и исхода заболевания. У умерших впоследствии больных концентрация данного показателя в крови превышала среднее значение у больных с успешно проведенным лечением более чем в 6 раз. При этом в основной группе не было выявлено существенного изменения данного показателя в динамике успешного лечения, в то время как в контрольной группе просматривалась направленность к увеличению уровня NGAL в ходе многокурсовой химиотерапии.

Групповой, а также индивидуальный анализ не выявил значимых изменений уровня L-FABR в процессе химиотерапевтического лечения в крови и моче большинства

обследованных больных ММ. Резкие колебания данного показателя у отдельных больных можно связать с характерными для них побочными заболеваниями, а также с негативным течением онкологического процесса.

Таким образом, прослеживается связь уровня исследованных показателей почечного повреждения с клиническими особенностями состояния отдельных больных и успешностью и переносимостью химиотерапевтического лечения ММ.

Результаты, полученные при мониторинге состояния почек по уровню маркеров ОПП у больных ММ, интересно сопоставить с данными проведенных в нашем институте экспериментальных исследований, в которых показано, что при ишемии, вызванной блокадой чревного сплетения крыс, имело место увеличение в ткани почки содержания ИЛ-18 и L-FABR, указывающее на повреждение канальцевого эпителия проксимальных канальцев, а также повышение уровня цистатина С, свидетельствующее о нарушении клубочковой фильтрации. При этом увеличение уровня КИМ-1, рассматриваемого в качестве маркера повреждения клеток, и NGAL, связанного со стимулированием пролиферации поврежденных клеток, наблюдается в ткани ишемизированной почки в более поздние сроки [26].

Выводы

1. У больных ММ до начала лечения выявлено повышение в крови уровня ИЛ-18 в 8,6 раза, КИМ-1 – в 3,1 раза, L-FABR – на 57,4% и цистатина С – на 48,4% и снижение уровня NGAL у 75% больных на 74,3% по сравнению с уровнем в группе здоровых, а в моче исходно увеличенным оказалось лишь содержание КИМ-1 в 2,4 раза и NGAL в 2,6 раза.

2. Проведение многокурсовой химиотерапии с предшествующим плазмообменом – более щадящий метод лечения больных ММ, о чем свидетельствует более низкий уровень двух маркеров раннего повреждения почек у больных основной группы по сравнению с контрольной группой: КИМ-1 в крови и моче после 1-го и 2-го курсов ХТ, а также ИЛ-18 в крови и моче после 1-го курса ХТ.

3. Для больных с летальным исходом характерен высокий уровень цистатина С в крови и моче, NGAL в крови, а также для некоторых больных – повышение уровня L-FABR в моче.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Hulin A., Royer B., Chatelut E., Le Guellec C. Level of evidence for therapeutic drug monitoring of cisplatin. *Therapie*. 2010; 65(3): 151-5.
- Dimopoulos M.A., Terpos E. Renal insufficiency and failure. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2010: 431-6.
- JCO Featured Abstracts on Multiple Myeloma from the 2018 ASCO Annual Meeting. *J. Clinical Oncology* - published online before print June 1; 2018.
- Титов В.Н., Ощепкова Е.В., Дмитриев В.А., Гушина О.В., Ширяева Ю.К., Яшин А.Я. Гиперурикемия – показатель нарушения биологических функций эндозологии и адаптации, биологических реакций экскреции, воспаления и артериального давления. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 4: 3-14.
- Любимова Н.В., Тимофеев Ю.С., Громова Е.Г., Вотякова О.М., Огнерубов Н.А., Кушлинский Н.Е. Селективная элиминация свободных легких цепей иммуноглобулинов у больных моноклональными гаммапатиями. *Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки*. Тамбов. 2017; 22(1): 142-7.

- Finkel K.W., Cohen E.P., Shirali A. Paraprotein-related kidney disease: evaluation and treatment of myeloma cast nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 11(12): 2273-9.
- Katagiri D., Noiri E., Hinoshita F. Multiple myeloma and kidney disease. *The Scientific World Journal*. 2013; ID 487285: 1-9.
- Dusseux E., Richez V., Appert-Flory A., Fischer F., Dodoi M., Vido L.A. et al. Acute kidney injury, multiple myeloma and heparin like syndrome. *European Journal of Medicine*. 2016; 12(2): 50-3.
- Fabbrini P., Finkel K., Gallieni M., Capasso G., Cavo M., Santoro A. et al. Light chains removal by extracorporeal techniques in acute kidney injury due to multiple myeloma: a position statement of the Onconephrology Work Group of the Italian Society of Nephrology. *J. Nephrol.* 2016; 29(6): 735-46.
- Sirota J.C., Klawitter J., Edelstein C.L. Biomarkers of acute kidney injury. *J. Toxicol.* 2011; 328120.
- Арапова О.И., Родионов В.В., Шутов А.М. Проблема ранней диагностики острого повреждения почек у онкологических больных. *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2014; 1: 24-30.
- Уразаева Л.И. Максудова А.Н. Биомаркеры раннего повреждения почек: обзор литературы. *Практическая медицина*. 2014; 1(4): 125-30.
- Шильов Е.М., Швецов М.Ю., Бобкова И.Н., Колина И.Б., Камышова Е.С. Хроническая болезнь почек и нефропротективная терапия. Методическое руководство для врачей. М.; 2012.
- KDIGO 2017 Clinical practice guideline update for diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease – Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int. Suppl.* 2017; 7(1): 1-59.
- Devarajan P. Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury. *Expert Opin Med. Diagn.* 2008; 2(4): 387-98.
- Parikh C.R., Abraham E., Ancukiewicz M., Edelstein C.L. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005; 16(10): 3046-52.
- Wyatt C.M., Malvestutto C., Coca S.G., Klotman P.E., Parikh C.R. The impact of hepatitis C virus coinfection on HIV-related kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *AIDS*. 2008; 22(14): 1799-1807.
- Дильдабекова А.С. Цистатин С в диагностике острых и хронических повреждений почек. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016; 11(1): 66-70.
- Franzintz E.M., Ushakova N.D., Kit O.I., Rozenko D.A., Dimitriadi S.N., Pogorelova Yu.A., Cheryarina N.D., Kozlova L.S. The dynamics of acute renal impairment markers during a surgery for kidney cancer. *General Reanimatology*. 2017; 13(6): 38-47.
- Кит О.И., Франциянц Е.М., Димитриади С.Н., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А. Роль маркеров острого повреждения почек в выборе тактики хирургического лечения больных раком почки. *Онкоурология*. 2015; 11(3): 34-9.
- Кит О.И., Франциянц Е.М., Розенко Д.А., Ушакова Н.Д., Димитриади С.Н., Погорелова Ю.А., Черярина Н.Д., Козлова Л.С., Бойко К.П., Гурнак В.В. Динамика маркеров острого повреждения почек при использовании эпидуральной блокады во время резекции в условиях тепловой ишемии. *Онкоурология*. 2017; 13(4): 25-33.
- Пролетов Я.Ю., Саганова Е.С., Галкина О.В. Роль некоторых биомаркеров в оценке характера хронического повреждения почек у пациентов с первичными гломерулопатиями. *Нефрология*. 2013; 1: 60-9.
- Shen S.J., Hu Z.X., Li Q.H. Implications of the changes in serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C in patients with chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2014; 19(3): 29-35.
- Коноплев Б.А., Алексеев А.В., Хашим Р.А. Липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов, – новый маркер острого повреждения почек и перинатальной асфиксии. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2017; 12(1): 93-8.
- Prkacin I., Ozvald I., Cavrić G., Balenović D., Bulum T., Flegar-Mestrić Z. Importance of urinary NGAL, serum creatinine standardization and estimated glomerular filtration rate in resistant hypertension. *Coll. Antropol.* 2013; 37(3): 7821-5.
- Кит О.И., Франциянц Е.М., Димитриади С.Н., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Швырев Д.А., Черярина Н.Д., Погорелова

Ю.А. Двустороннее нефропротективное влияние новокаиновой блокады в условиях моделирования односторонней ишемии-реперфузии почки в эксперименте. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2015; 3: 12-7.

REFERENCES

1. Hulin A., Royer B., Chatelut E., Le Guellec C. Level of evidence for therapeutic drug monitoring of cisplatin. *Therapie*. 2010; 65(3): 151-5.
2. Dimopoulos M.A., Terpos E. Renal insufficiency and failure. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ Program*. 2010: 431-6.
3. JCO Featured Abstracts on Multiple Myeloma from the 2018 ASCO Annual Meeting. *J. Clinical Oncology* - published online before print June 1; 2018.
4. Titov V.N., Oshepkova E.V., Dmitriev V.A., Gushina O.V., Shiryaeva Yu.K., Yashin A.Ya. Hyperuricemia is an indicator of disruption of biological functions of endoecology and adaptation, biological reactions of excretion, inflammation and arterial pressure. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 4: 3-14. (in Russian)
5. Lyubimova N.V., Timofeev Yu.S., Gromova E.G., Votyakova O.M., Ognerubov N.A., Kushlinskij N.E. Selective elimination of free light chains of immunoglobulins in patients with monoclonal gammopathy. *Vestnik Tambovskogo universiteta. Seriya Estestvennye i tehnicheckie nauki*. Tambov. 2017; 22(1): 142-7. (in Russian)
6. Finkel K.W., Cohen E.P., Shirali A. Paraprotein-related kidney disease: evaluation and treatment of myeloma cast nephropathy. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol*. 2016; 11(12): 2273-9.
7. Katagiri D., Noiri E., Hinoshita F. Multiple myeloma and kidney disease. *The Scientific World Journal*. 2013; ID 487285: 1-9.
8. Dusseux E., Richez V., Appert-Flory A., Fischer F., Dodoi M., Vido L.A. et al. Acute kidney injury, multiple myeloma and heparin like syndrome. *European Journal of Medicine*. 2016; 12(2): 50-3.
9. Fabbrini P., Finkel K., Gallieni M., Capasso G., Cavo M., Santoro A. et al. Light chains removal by extracorporeal techniques in acute kidney injury due to multiple myeloma: a position statement of the Onconephrology Work Group of the Italian Society of Nephrology. *J. Nephrol*. 2016; 29(6): 735-46.
10. Sirota J.C., Klawitter J., Edelstein C.L. Biomarkers of acute kidney injury. *J. Toxicol*. 2011; 328120.
11. Arapova O.I., Rodionov V.V., Shutov A.M. The problem of early diagnosis of acute kidney damage in cancer patients. *Ul'yanovskiy mediko-biologicheskij zhurnal*. 2014; 1: 24-30. (in Russian)
12. Urazaeva L.I. Maksudova A.N. Biomarkers of early kidney damage: a literature review. *Prakticheskaya meditsina*. 2014; 1(4): 125-30. (in Russian)
13. Shilov E.M., Shvecov M.Yu., Bobkova I.N., Kolina I.B., Kamyshova E.S. Chronic kidney disease and nephroprotective therapy [Khronicheskaya bolezni' pochek I nefroprotektivnaya terapiya]. Metodicheskoe rukovodstvo dlya vrachey. Moscow; 2012. (in Russian)
14. KDIGO 2017 Clinical practice guideline update for diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease – Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int. Suppl*. 2017; 7(1): 1-59.
15. Devarajan P. Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury. *Expert Opin Med. Diagn*. 2008; 2(4): 387-98.
16. Parikh C.R., Abraham E., Ancukiewicz M., Edelstein C.L. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2005; 16(10): 3046-52.
17. Wyatt C.M., Malvestutto C., Coca S.G., Klotman P.E., Parikh C.R. The impact of hepatitis C virus coinfection on HIV-related kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *AIDS*. 2008; 22(14): 1799-1807.
18. Dildabekova A.S. Cystatin C in the diagnosis of acute and chronic kidney damage. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy*. 2016; 11(1): 66-70. (in Russian)
19. Franzintz E.M., Ushakova N.D., Kit O.I., Rozenko D.A., Dimitriadi S.N., Pogorelova Yu.A., Cheryarina N.D., Kozlova L.S. The dynamics of acute renal impairment markers during a surgery for kidney cancer. *General Reanimatology*. 2017; 13(6): 38-47.
20. Kit O.I., Franciyanc E.M., Dimitriadi S.N., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A. The role of markers of acute renal damage in the choice of tactics for surgical treatment of patients with kidney cancer. *Onkourologiya*. 2015, 11(3): 34-39. (in Russian)
21. Kit O.I., Franciyanc E.M., Rozenko D.A., Ushakova N.D., Dimitriadi S.N., Pogorelova Yu.A., Cheryarina N.D., Kozlova L.S., Bojko K.P., Gurnak V.V. Dynamics of markers of acute renal damage when using epidural blockade during resection under conditions of thermal ischemia. *Onkourologiya*. 2017; 13(4): 25-33. (in Russian)
22. Proletov Ya.Yu., Saganova E.S., Galkina O.V. The role of some biomarkers in assessing the nature of chronic kidney damage in patients with primary glomerulopathies. *Nefrologiya*. 2013; 1: 60-9. (in Russian)
23. Shen S.J., Hu Z.X., Li Q.H. Implications of the changes in serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C in patients with chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2014; 19(3): 29-35.
24. Konoplev B.A., Alekseev A.V., Hashim R.A. Lipocalin, associated with neutrophil gelatinase, is a new marker of acute kidney damage and perinatal asphyxia. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2017; 12(1): 93-8. (in Russian)
25. Prkacin I., Ozvald I., Cavrić G., Balenović D., Bulum T., Flegar-Mestrić Z. Importance of urinary NGAL, serum creatinine standardization and estimated glomerular filtration rate in resistant hypertension. *Coll. Antropol*. 2013; 37(3): 7821-5.
26. Kit O.I., Franciyanc E.M., Dimitriadi S.N., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Shvyrev D.A., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A. Two-sided nephroprotective effect of novocaine blockade under conditions of one-sided ischemia-reperfusion modeling of the kidney in the experiment. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya urologiya*. 2015; 3: 12-7. (in Russian)

Поступила 16.07.18

Принята к печати 10.12.18

ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ГНОЙНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПАНКРЕОНЕКРОЗА

¹ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, 153012, Иваново, Россия

²ОБУЗ «Ивановская областная клиническая больница», 153040, Иваново, Россия

Цель работы — оценка информативности показателей летучих жирных кислот (ЛЖК) для дифференциальной диагностики инфицированного панкреонекроза (ИПН), осложненного флегмонами забрюшинной клетчатки, и ИПН, осложненного панкреатическими абсцессами. Работа основана на результатах обследования и лечения 52 больных с ИПН, осложненным абсцессами и флегмонами. Проведен анализ концентраций ЛЖК: уксусной, пропионовой, масляной и изовалериановой кислот на автоматизированном газовом хроматографе модели «Кристаллюкс-4000» с капиллярной колонкой «HP-FFAP». Показатели уксусной, пропионовой, масляной кислот и суммы ЛЖК статистически значимо выше у больных с ИПН, осложненным флегмонами забрюшинной клетчатки, по сравнению с показателями ЛЖК больных с ИПН, осложненным панкреатическими абсцессами. Показатели уксусной кислоты и суммы ЛЖК статистически значимо выше, у больных с ИПН, осложненным парапанкреатическими флегмонами, по сравнению с показателями ЛЖК больных с ИПН, осложненным панкреатическими абсцессами. Показатели уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот и суммы ЛЖК статистически значимо выше у больных с ИПН, осложненным параколическими флегмонами, по сравнению с показателями ЛЖК больных с ИПН, осложненным панкреатическими абсцессами. Показатели уксусной, пропионовой, масляной кислот и суммы ЛЖК статистически значимо выше, у больных с ИПН, осложненным тотальными забрюшинными флегмонами, по сравнению с показателями ЛЖК больных с ИПН, осложненным панкреатическими абсцессами. Показатели ЛЖК можно использовать как дополнительные критерии для дифференциальной диагностики ИПН, осложненного флегмонами забрюшинной клетчатки, и ИПН, осложненного панкреатическими абсцессами.

Ключевые слова: панкреонекроз; панкреатический абсцесс; флегмона забрюшинной клетчатки; диагностика; летучие жирные кислоты.

Для цитирования: Акайзин Э.С., Гагуа А.К., Метелев А.С. Значение показателей летучих жирных кислот для дифференциальной диагностики гнойных осложнений панкреонекроза. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (12): 750-755. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-750-755>

Akayzin E.S.¹, Gagua A.K.¹, Metelev A.S.²

THE VOLATILE FATTY ACIDS INDICATORS IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF PURULENT COMPLICATIONS OF PANCREATIC NECROSIS

¹Ivanovo State Medical Academy, 153012, Ivanovo, Russian Federation;

²Ivanovo Regional Clinical Hospital, 153040, Ivanovo, Russian Federation

The purpose of the study was to evaluate the informative value of volatile fatty acid (VFA) indicators for the differential diagnosis of infected pancreatic necrosis (IPN), complicated by retroperitoneal cellulose phlegmons and IPN, complicated by pancreatic abscesses. The work is based on the results of the examination and treatment of 52 patients with IPN, complicated by abscesses and phlegmon. The analysis of the concentrations of acetic, propionic, butyric and isovaleric acids were carried out on the gas chromatograph "Crystallux-4000" with the capillary "HP-FFAP" column. Indicators of acetic, propionic, butyric acids and the amount of VFA were statistically significantly higher in patients with IPN, complicated by retroperitoneal cellulose phlegmons, compared with those of VFA in patients with IPN, complicated by pancreatic abscesses. Indicators of acetic acid and the amount of VFA were statistically significantly higher in patients with IPN, complicated by parapancreatic phlegmon, compared with those of VFA in patients with IPN, complicated by pancreatic abscesses. Indicators of acetic, propionic, butyric, isovaleric acid and the amount of VFA were statistically significantly higher in patients with IPN, complicated by paracolic phlegmon, compared with patients with IPN, complicated by pancreatic abscesses. Indicators of acetic, propionic, butyric acids and the amount of VFA were statistically significantly higher in patients with IPN, complicated by total retroperitoneal phlegmon, compared with patients with IPN, complicated by pancreatic abscesses. The values of VFA can be used as additional criteria for the differential diagnosis between IPN, complicated by retroperitoneal phlegmon and IPN, complicated by pancreatic abscess.

Key words: pancreatic necrosis, pancreatic abscess, retroperitoneal phlegmon, diagnostics, volatile fatty acids.

For citation: Akayzin E.S., Gagua A.K., Metelev A.S. The volatile fatty acids indicators in the differential diagnosis of purulent complications of pancreatic necrosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (12): 750-755 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-750-755>

For correspondence: Akayzin E.S., doctor of medicine (MD), professor of the microbiology department; E-mail: ed.s.a@mail.ru

Information about authors:

Akayzin E.S., <https://orcid.org/0000-0002-4600-8054>

Gagua A.K., <https://orcid.org/0000-0001-7496-5540>

Metelev A.S., <https://orcid.org/0000-0003-4922-1800>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 06.12.2018
Accepted 12.12.2018

Введение. Поздняя диагностика осложнений острого панкреатита, неадекватный выбор консервативного и хирургического лечения приводят к высокой летальности. Для деструктивного панкреатита характерна закономерная трансформация стерильных форм в инфицированные. Микроорганизмы, колонизирующие кишечник, в первые 2 недели способны транслоцироваться в некротические ткани [1]. Инфицированный панкреонекроз (ИПН) может быть отграниченным от здоровых тканей (абсцесс) или неотграниченным (гнойно-некротический парапанкреатит). Среди гнойно-септических осложнений острого некротического панкреатита наибольший практический интерес представляют абсцесс поджелудочной железы и забрюшинная флегмона, что обусловлено трудностью их диагностики и опасностью развития тяжелых вторичных осложнений. Абсцесс поджелудочной железы обычно развивается при тяжелой форме панкреонекроза и иногда при вторичном инфицировании псевдокисты поджелудочной железы. Ранняя диагностика гнойно-септических осложнений основана на результатах ультразвукового исследования (УЗИ) и мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ) органов брюшной полости. При диагностике гнойно-септических осложнений острого некротического панкреатита характерны отсутствие гипермилаземии, наличие лейкоцитоза, нейтрофилез с палочкоядерным сдвигом влево, повышение концентрации С-реактивного белка [2]. Для выявления признаки инфицирования при ИПН используют воспалительные маркеры (фибриноген, С-реактивный белок, прокальцитонин и др.), результаты бактериологического посева аспирата, полученного при пункции тонкой иглой [3]. Многообразие используемых в настоящее время лабораторных и инструментальных методов диагностики свидетельствует о том, что ни один из них в полной мере не удовлетворяет запросам клиницистов, так как не всегда позволяет достоверно и своевременно выявлять наличие инфицирования некротически измененных тканей поджелудочной железы и забрюшинной клетчатки у пациентов с деструктивным панкреатитом [4-9]. Поэтому сегодня одним из актуальных направлений является совершенствование существующих и поиск новых, патогенетически обоснованных методов диагностики ИПН [10]. На практике известна проблема дифференциальной диагностики панкреатических абсцессов и флегмон забрюшинной клетчатки, особенно, в начальной стадии их развития.

Летучие жирные кислоты (ЛЖК) – метаболиты факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных бактерий [11-16]. Этиологическими агентами гнойной инфекции часто являются условно-патогенные микроорганизмы, среди которых возрастает роль неклостридиальных анаэробных бактерий. Для оптимизации диагностики и лечения гнойной инфекции необходимо быстро обнаружить возбудителей, их классификация как аэробов (факультативных анаэробов) или облигатных анаэробов для выбора адекватного лечения [11, 16]. Анализ ЛЖК в качестве специфичных метаболитов облигатных анаэробов используют для экспресс-диагностики возбудителей клостридиальной и неклостридиальной анаэробной инфекции [15-26] и диагностики дисбактериозов [27-30]. Определение содержания ЛЖК в биоптатах поджелудочной железы и периферической крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией, позволило доказать роль анаэробной неклостридиальной инфек-

ции в развитии ИПН [5]. По данным проведенных нами ранее исследований с использованием метода газовой хроматографии, установлена информативность показателей ЛЖК крови для диагностики ИПН [9]. Значение анаэробной микрофлоры и ЛЖК для дифференциальной диагностики гнойных осложнений панкреонекроза до настоящего времени изучено недостаточно.

Цель исследования — оценка информативности показателей ЛЖК для дифференциальной диагностики ИПН, осложненного флегмонами забрюшинной клетчатки, и ИПН, осложненного панкреатическими абсцессами.

Материал и методы. Работа основана на результатах обследования и лечения 52 больных с ИПН, которые находились в хирургическом отделении для взрослых пациентов Ивановской областной клинической больницы (ретроспективное исследование). Возраст пациентов составлял от 21 года до 84 лет (44 ± 3 года), среди которых было 40 (77%) мужчин и 12 (23%) женщин. Причины возникновения ИПН: прием алкоголя, желчнокаменная болезнь, травма поджелудочной железы, осложнение эндоскопической ретроградной холангиопанкреатографии с эндоскопической папиллосфинктеротомией. Диагноз ИПН устанавливали на основании клинических данных, результатов УЗИ, МСКТ, а также лабораторных показателей. На основании выполненных процедур выделены две группы пациентов. В 1-ю группу мы включили 44 больных с ИПН, осложненным флегмоной забрюшинной клетчатки: 16 больных с ИПН, осложненным парапанкреатическими флегмонами, 14 пациентов с ИПН, осложненным параколическими флегмонами, 14 пациентов с ИПН, осложненным тотальными забрюшинными флегмонами. 2-ю группу составили 8 пациентов с ИПН, осложненным панкреатическим абсцессом. Всем больным проводили интенсивное консервативное лечение, выполнялись разные оперативные вмешательства, эффективность которых оценивали на основании клинико-лабораторных данных, а также инструментальных методик обследования.

После установления диагноза ИПН всем пациентам проводили анализ концентраций ЛЖК: уксусной, пропионовой, масляной и изовалериановой в крови хроматографическим методом. Подготовка образцов крови для хроматографии выполнена методом жидкостной экстракции диэтиловым эфиром [16]. Газо-жидкостную хроматографию для количественного определения уксусной, пропионовой, масляной и изовалериановой кислот выполняли на автоматизированном газовом хроматографе модели «Кристаллюкс-4000» с капиллярной колонкой «HP-FFAP» Agilent Technologies (длина – 50 м; диаметр – 0,32 мм; толщина фазы – 0,5 мкм) и пламенно-ионизационным детектором; газ-носитель – гелий [12, 26]. Идентификацию и количественное определение концентраций ЛЖК осуществляли при помощи аналитических стандартных образцов и программного комплекса для обработки хроматографических данных «МультиХром». Продолжительность хроматографического анализа ЛЖК составляла 40-60 мин с момента доставки исследуемого материала в лабораторию. Рассчитывали сумму ЛЖК. Анаэробный индекс рассчитывали путем деления суммы концентраций пропионовой, масляной и изовалериановой кислот на концентрацию уксусной кислоты.

Для статистического анализа применяли специализированный пакет программ «Statistica 6.0» (StatSoft, Inc).

Таблица 1

Содержание летучих жирных кислот (в ммоль/л) у больных с инфицированным панкреонекрозом, осложненным флегмонами забрюшинной клетчатки, и больных с инфицированным панкреонекрозом, осложненным панкреатическими абсцессами.

Показатели, ммоль/л	забрюшинная флегмона; n = 44			панкреатический абсцесс; n = 8		
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
уксусная кислота*	0,43000	0,36000	0,56000	0,21000	0,16000	0,25000
пропионовая кислота**	0,01900	0,00835	0,03250	0,00815	0,00760	0,00900
масляная кислота***	0,00365	0,00315	0,00460	0,00300	0,00280	0,00325
изовалериановая кислота	0,00015	0,00009	0,00040	0,00011	0,00007	0,00013
сумма ЛЖК*	0,46635	0,38186	0,58265	0,22152	0,17042	0,26038
анаэробный индекс	0,05327	0,03323	0,08805	0,04950	0,04448	0,07663

Примечания. Различия значимы: * – $p < 0,001$; ** – $p = 0,015$; *** – $p = 0,014$. U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 2

Содержание летучих жирных кислот (в ммоль/л) у больных с инфицированным панкреонекрозом, осложненным парапанкреатическими флегмонами, и больных с инфицированным панкреонекрозом, осложненным панкреатическими абсцессами.

Показатели, ммоль/л	парапанкреатическая флегмона, n = 16			панкреатический абсцесс, n = 8		
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
уксусная кислота*	0,32000	0,28500	0,38500	0,21000	0,16000	0,25000
пропионовая кислота	0,00835	0,00710	0,01700	0,00815	0,00760	0,00900
масляная кислота	0,00320	0,00300	0,00365	0,00300	0,00280	0,00325
изовалериановая кислота	0,00010	0,00008	0,00030	0,00011	0,00007	0,00013
сумма ЛЖК*	0,34148	0,30082	0,40255	0,22152	0,17042	0,26038
анаэробный индекс	0,04182	0,03030	0,06287	0,04950	0,04448	0,07663

Примечания. Различия значимы: * – $p < 0,001$. U-критерий Манна-Уитни.

Использовались следующие методы анализа: расчет размера выборки на основе статистической мощности; проверка нормальности распределения количественных признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка; оценка значимости различий количественных признаков в независимых выборках с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Расчет объема выборки исследования, необходимого для достижения требуемой мощности, выполнен по показателю уксусной кислоты. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$. В таблице приведены непараметрические статистические показатели: медиана, нижний и верхний квартили.

Результаты. У пациентов диагностирован разной степени распространенности ИПН, осложненный панкреатическими абсцессами и флегмонами забрюшинной клетчатки. Для сравнения показателей ЛЖК у больных с

ИПН, осложненным панкреатическими абсцессами и флегмонами забрюшинной клетчатки, мы использовали концентрации ЛЖК практически здоровых доноров [15]. Мы рассчитали показатели для крови доноров: сумма ЛЖК – 0,0038 и анаэробный индекс – 2,8000. При сравнении показателей ЛЖК крови у больных с ИПН, осложненным панкреатическими абсцессами и флегмонами забрюшинной клетчатки, со значениями практически здоровых доноров установлены более высокие показатели у больных с ИПН: уксусной кислоты в 100 % проб, пропионовой кислоты в 100 % проб, масляной кислоты в 98 % проб, суммы ЛЖК в 100 % проб и более низкие показатели: изовалериановой кислоты в 96 % проб, анаэробного индекса в 100 % проб.

Для достижения 90% достоверности исследования при уровне ошибки первого рода в 5%, требуемый объем выборки составил 7 пациентов. Распределение концентраций ЛЖК отличается от нормального, поэтому для описания данных использовали непараметрические статистические показатели, для оценки значимости различий количественных признаков в независимых выборках использован непараметрический U-критерий Манна-Уитни. В табл. 1 представлены: анаэробный индекс, содержание уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот и сумма ЛЖК в крови у пациентов с ИПН, осложненным флегмонами забрюшинной клетчатки, и больных с ИПН, осложненным панкреатическими абсцессами.

Показатели уксусной, пропионовой, масляной кислот и суммы ЛЖК статистически значимо выше у больных с ИПН, осложненным флегмонами забрюшинной клетчатки, по сравнению с показателями ЛЖК больных с ИПН, осложненным панкреатическими абсцессами. По показателю изовалериановой кислоты статистически значимых различий между группами не было ($p = 0,122$). По показателю анаэробного индекса различия между группами отсутствовали.

Показатели уксусной кислоты и суммы ЛЖК статистически значимо выше, у больных с ИПН, осложненным парапанкреатическими флегмонами, по сравнению с показателями ЛЖК больных с ИПН, осложненным панкреатическими абсцессами. По анаэробному индексу и показателям изовалериановой, пропионовой, масляной кислот статистически значимых различий между группами не было (табл.2).

Показатели уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот и суммы ЛЖК статистически значимо выше у пациентов с ИПН, осложненным парапанкреатическими флегмонами, по сравнению с показателями ЛЖК больных с ИПН, осложненным панкреатическими абсцессами. По показателю анаэробного индекса статистически значимых различий между группами не было (табл.3).

Показатели уксусной, пропионовой, масляной кислот и суммы ЛЖК статистически значимо выше, у больных с ИПН, осложненным тотальными забрюшинными флегмонами, по сравнению с показателями ЛЖК больных с ИПН, осложненным панкреатическими абсцессами. По показателю изовалериановой кислоты статистически значимых различий между группами не было ($p = 0,133$). По показателю анаэробного индекса различия между группами отсутствовали (табл.4).

Обсуждение. Хроматографический метод отличается

Таблица 3

Содержание летучих жирных кислот (в ммоль/л) у больных с инфицированным панкреонекрозом, осложненным параколическими флегмонами, и больных с инфицированным панкреонекрозом, осложненным панкреатическими абсцессами.

Показатели, ммоль/л	Параколическая флегмона, n = 14			Панкреатический абсцесс, n = 8		
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
уксусная кислота*	0,43000	0,42000	0,47000	0,21000	0,16000	0,25000
пропионовая кислота**	0,03100	0,00870	0,04600	0,00815	0,00760	0,00900
масляная кислота***	0,00365	0,00310	0,00450	0,00300	0,00280	0,00325
изовалериановая кислота***	0,00035	0,00010	0,00051	0,00011	0,00007	0,00013
сумма ЛЖК*	0,47251	0,44208	0,49011	0,22152	0,17042	0,26038
анаэробный индекс	0,07211	0,02810	0,11389	0,04950	0,04448	0,07663

Примечания. Различия значимы: * – $p < 0,001$; ** – $p = 0,034$; *** – $p = 0,024$. U-критерий Манна-Уитни.

Таблица 4

Содержание летучих жирных кислот (в ммоль/л) у больных с инфицированным панкреонекрозом, осложненным тотальными забрюшинными флегмонами, и больных с инфицированным панкреонекрозом, осложненным панкреатическими абсцессами

Показатели, ммоль/л	тотальная забрюшинная флегмона, n = 14			панкреатический абсцесс, n = 8		
	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
уксусная кислота*	0,58500	0,56000	0,62000	0,21000	0,16000	0,25000
пропионовая кислота*	0,02600	0,01800	0,5800	0,00815	0,00760	0,00900
масляная кислота**	0,00470	0,00390	0,00560	0,00300	0,00280	0,00325
изовалериановая кислота	0,00014	0,00010	0,00031	0,00011	0,00007	0,00013
сумма ЛЖК*	0,62767	0,58370	0,65665	0,22152	0,17042	0,26038
анаэробный индекс	0,05755	0,03438	0,08907	0,04950	0,04448	0,07663

Примечания. Различия значимы: * – $p < 0,001$; ** – $p = 0,004$. U-критерий Манна-Уитни.

от традиционного бактериологического исследования высокой чувствительностью и быстротой получения результатов [12, 16]. Повышение показателей уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот и суммы ЛЖК отражает важную роль микроорганизмов и их метаболитов в патогенезе гнойных осложнений ИПН. Уксусную кислоту образуют факультативные и облигатные анаэробы, пропионовую продуцируют преимущественно облигатные анаэробы, а масляная, изомаляная, валериановая и изовалериановая кислоты являются специфическими метаболитами клостридиальных и неклостридиальных облигатных анаэробов [12, 13, 15, 16]. В настоящее время чаще всего гнойно-воспалительные заболевания вызывают ассоциации возбудителей. Анаэробный индекс характеризует удельный вес облигатных анаэробов в микробной ассоциации. Из всех показателей ЛЖК для дифференциальной диагностики осложнений ИПН наиболее статистически значимыми были изменения уксусной кислоты и суммы ЛЖК ($p < 0,001$). Это связано

с тем, что эти показатели отражают всю сумму метаболитов факультативно-анаэробных и облигатно-анаэробных бактерий, которые являются этиологическими агентами ИПН, осложненного панкреатическими абсцессами, и ИПН, осложненного флегмонами забрюшинной клетчатки. В проведенных нами ранее исследованиях с использованием метода газовой хроматографии использовали показатели уксусной, пропионовой, масляной и изовалериановой кислот крови для диагностики инфицированного панкреонекроза [9].

Флегмона забрюшинной клетчатки – инфицирование клетчатки вокруг поджелудочной железы. Основным источником инфекции является эндогенная транслокация микробов. Диагноз подтверждается УЗИ или МСКТ [3]. Предлагаем дополнить результаты УЗИ или МСКТ информацией о содержании ЛЖК в крови при осложнениях панкреонекроза. Хроматографический анализ ЛЖК в крови отражает не только факт инфицирования панкреонекроза, но и распространенность патологического процесса. В настоящей работе предлагаем дополнительно использовать показатель суммы ЛЖК и анаэробный индекс. Показатель суммы ЛЖК обладает такой же высокой информативностью как и показатель уксусной кислоты. Это связано с тем, что уксусная кислота вносит наибольший количественный вклад в сумму ЛЖК.

Показатели уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот и суммы ЛЖК являются информативными критериями для дифференциальной диагностики ИПН, осложненного панкреатическими абсцессами, и ИПН, осложненного флегмонами забрюшинной клетчатки.

Выводы.

1. Показатели ЛЖК можно использовать как дополнительные критерии для дифференциальной диагностики ИПН, осложненного флегмонами забрюшинной клетчатки, и ИПН, осложненного панкреатическими абсцессами.

2. Показатели уксусной кислоты и суммы ЛЖК можно использовать как дополнительные критерии для дифференциальной диагностики ИПН, осложненного парапанкреатической флегмоной, и ИПН, осложненного панкреатическим абсцессом.

3. Показатели уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой кислот и суммы ЛЖК можно использовать как дополнительные критерии для дифференциальной диагностики ИПН, осложненного параколической флегмоной, и ИПН, осложненного панкреатическим абсцессом.

4. Показатели уксусной, пропионовой, масляной кислот и суммы ЛЖК можно использовать как дополнительные критерии для дифференциальной диагностики ИПН, осложненного тотальной забрюшинной флегмоной, и ИПН, осложненного панкреатическим абсцессом.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 13, 27 см. REFERENCES)

1. Затевахин И.И., Кириенко А.И., Кубышкин В.А., ред. Абдоминальная хирургия. Национальное руководство: краткое издание. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016.
2. Волков В.Е., Чеснокова Н.Н. Острый некротический панкреатит: актуальные вопросы классификации, диагностики и лечения локальных и распространенных гнойно-некротических процессов. *Вестник Чувашского университета*. 2014; 2: 211-7.
3. Абдуллаев Э.Г., Бабышин В.В., Гусев А.В. Неотложная хирургия (Протоколы клинических рекомендаций по диагностике и лечению ОХЗ органов брюшной полости). Владимир: Изд-во ВлГУ; 2015.
5. Буткевич А.Ц., Истратов В.Г., Бровкин А.Е., Наливайский А.А., Рябков М.Г., Клычкова Е.В. Комплексная оценка тяжести и эффективности интенсивной терапии панкреонекроза. *Московский хирургический журнал*. 2014; 3: 28-32.
6. Овсяник Д. М., Фомин А. В. Аспекты патоморфогенеза и диагностики инфицированного панкреонекроза (обзор литературы). *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2014; 3: 92-102.
7. Иваненков И.М., Гагуа А.К., Акайзин Э.С. Возможности постоянной вено-венозной гемодиализации в комплексном лечении инфицированного панкреонекроза. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2014; 4: 84-5.
8. Гагуа А.К., Иваненков И.М., Терехов А.Н. Роль летучих жирных кислот в диагностике и оценке эффективности комплексного лечения инфицированного панкреонекроза. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2014; 7(4): 364-8.
9. Гагуа А.К., Иваненков И.М., Воробьев П.Ю. Возможности использования летучих жирных кислот в ранней диагностике инфицированного панкреонекроза. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2014; 11: 13-6.
10. Ермолов А.С., Иванов П.А., Благовестнов Д.А., Гришин А.А. Диагностика и лечение острого панкреатита. М.: Видар; 2013.
11. Гагуа А.К., Акайзин Э.С., Вальков К.С. Использование летучих жирных кислот для экспресс-диагностики анаэробной неклостридиальной инфекции при гнойном холангите у больных механической желтухой. *Московский хирургический журнал*. 2016; 2: 23-7.
12. Акайзин Э.С., Акайзина А.Э. Летучие жирные кислоты у детей с дисфункцией билиарного тракта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 2: 112-5.
14. Вальков К.С., Гагуа А.К., Акайзин Э.С., Алексахина Е.Л. Динамика показателей летучих жирных кислот, цитрулина и малонового диальдегида в комплексной оценке печёночной недостаточности у больных механической желтухой с гнойным холангитом. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2016; 2: 40-5.
15. Истратов В.Г., Мионов А.Ю., Руднева В.Г., Горшенина И.Ю., Воробьев А.А. Изучение патогенетических механизмов интоксикации у больных анаэробной неклостридиальной инфекцией. *Вестник Российской Академии медицинских наук*. 1996; 2: 41-3.
16. Акайзин Э.С., Кулагин В.Ф., Слюсар С.Г. Экспресс-диагностика возбудителей гнойной инфекции и быстрая оценка эффективности лечения у больных с осложненной травмой. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 1997; 2(4): 17-20.
17. Акайзин Э.С., Булыгина В.В. Новые возможности экспресс-диагностики возбудителей гнойной инфекции и быстрой оценки эффективности лечения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1999; 6: 45-7.
18. Герасименко С.С., Шилев Р.Р., Акайзин Э.С. Диагностика омфалитов у новорожденных, протекающих с участием анаэробной микрофлоры. *Вестник новых медицинских технологий*. 2008. 15(2): 112-3.
19. Покровский Е.Ж., Станкевич А.М., Акайзин Э.С. Диагностическое значение содержания летучих жирных кислот в крови и экссудате брюшной полости при распространенном перитоните. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2012; 2: 45-7.
20. Белобородова Н.В. Интеграция метаболизма человека и его микробиома при критических состояниях. *Общая реаниматология*. 2012; VIII(4): 42-54.
21. Мионов А.Ю., Митрохин С.Д., Ардатская М.Д., Шевцов В.В., Жакот А.Н. Диагностическое и прогностическое значение метаболитов микрофлоры в различных биосубстратах у больных раком легкого и ХОБЛ. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 9: 83-4.
22. Мионов А.Ю. Газовая хроматография и масс-спектрометрия в диагностике анаэробов. *Альманах клинической медицины*. 2012; 26: 45-51.
23. Мионов А.Ю., Зур Н.В. Молекулярные маркеры патогенов. М.: ООО Тираж; 2013.
24. Ардатская М.Д., Шевцов В.В., Жакот А.Н., Феданков И.Н., Митрохин С.Д., Мионов А.Ю. и др. Метаболиты микрофлоры различных биотопов при заболеваниях бронхолегочной системы. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2014; 103(3): 46-54.
25. Затевалов А.М., Селькова Е.П., Афанасьев С.С., Алёшкин А.В., Мионов А.Ю., Гусарова М.П. и др. Оценка степени микробиологических нарушений микрофлоры ротоглотки и кишечника с помощью методов математического моделирования. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(2): 117-21.
26. Акайзин Э.С., Кулагин В.Ф. Анализ количественного содержания летучих жирных кислот в диагностике гнойной инфекции у больных с осложненной травмой и в оценке эффективности лечения. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2017; 4: 57-8.
28. Урсу Т.Н., Чемоданов В.В., Шниткова Е.В., Акайзин Э.С. Особенности моторно-эвакуаторной функции пищеварительного тракта у новорожденных детей. *Практическая медицина*. 2012. 5(60): 62-4.
29. Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Караулов А.В., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Алешкин А.В. и др. Микробиоценозы и здоровье человека. М.: Династия; 2015.
30. Алёшкин В.А., Селькова Е.П., Затевалов А.М., Мионов А.Ю., Волчецкий А.Л., Гудова Н.Н. Федеральные клинические рекомендации. Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника. Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье; 2016.

REFERENCES

1. Zatevakhin I.I., Kiriienko A.I., Kubyskhin V.A., eds. Abdominal surgery. National Leadership: Short Edition [Abdominal'naya khirurgiya. Natsional'noye rukovodstvo: kratkoye izdaniye]. Moscow: GEOTAR-Media; 2016. (in Russian)
2. Volkov V.Ye., Chesnokova N.N. Acute necrotic pancreatitis: current issues of classification, diagnosis and treatment of local and common purulent-necrotic processes. *Vestnik Chuvashskogo universiteta*. 2014; 2: 211-7. (in Russian)
3. Abdullayev E.G., Babyshin V.V., Gusev A.V. Emergency surgery (Protocols of clinical guidelines for the diagnosis and treatment of TSS abdominal organs) [Neotlozhnaya khirurgiya (Protokoly klinicheskikh rekomendatsiy po diagnostike i lecheniyu OKHZ organov bryushnoy polosti)]. Vladimir: Izd-vo VIGU; 2015. (in Russian)
4. The New Revised Classification of Acute Pancreatitis 2012 / M.G. Sarr, P.A. Banks, T.L. Bollen [et al.]. *Surgical Clinics of North America*. 2013; 93(3): 549-62.
5. Butkevich A.TS., Istratov V.G., Brovkin A.E., Nalivayskiy A.A., Ryabkov M.G., Klychnikova E.V. Comprehensive assessment of the severity and the effectiveness of intensive therapy of pancreatic necrosis. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2014; 3: 28-32. (in Russian)
6. Ovsyanik D.M., Fomin A.V. Aspects of pathomorphogenesis and diagnosis of infected pancreatic necrosis (literature review). *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2014; 3: 92-102. (in Russian)
7. Ivanenkov I.M., Gagua A.K., Akayzin E.S. The possibilities of permanent veno-venous hemodiafiltration in complex treatment for infected pancreonecrosis. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2014; 4: 84-5. (in Russian)
8. Gagua A.K., Ivanenkov I.M., Terekhov A.N. The role of volatile fatty acids in the diagnosis and evaluation of the effectiveness of complex treatment of infected pancreatic necrosis. *Vestnik eksperimental'noy*

- i klinicheskoy khirurgii*. 2014; 7(4): 364-8. (in Russian).
9. Gagua A.K., Ivanenkov I.M., Vorob'ev P.Iu. Opportunities for volatile fatty acids using in early diagnostics of infected pancreonecrosis. *Khirurgiya. Zhurnal imeni N.I. Pirogova*. 2014; 11: 13-6. (in Russian)
 10. Yermolov A.S., Ivanov P.A., Blagovestnov D.A., Grishin A.A. Diagnosis and treatment of acute pancreatitis. [Diagnostika i lecheniye ostrogo pankreatita]. Moscow: Vidar; 2013. (in Russian)
 11. Gagua A.K., Akayzin E.S., Val'kov K.S. The use of volatile fatty acids for the rapid diagnosis of anaerobic non-clostridial infection with purulent cholangitis in patients with obstructive jaundice. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2016; 2: 23-7. (in Russian)
 12. Akaizin E.S., Akaizina A.E. The volatile fatty acids in children with dysfunction of biliary tract. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2017; 2: 112-5. (in Russian)
 13. Den Besten G., van Eunen K., Groen A.K., Venema K., Reijngoud D.-J., Bakker B.M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*. 2013; 54(9): 2325-40.
 14. Valkov K.S., Gagua A.K., Akaizin E.S., Aleksakhina E.L. The dynamics of the indices of volatile fatty acids, citrulline and malondialdehyde in the complex evaluation of hepatic insufficiency in patients with mechanical jaundice and purulent cholangitis. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2016; 2: 40-5. (in Russian)
 15. Istratov V.G., Mironov A.Yu., Rudneva V.G., Gorshenina I.Yu., Vorobev A.A. Study of pathogenetic mechanisms of intoxication in patients with anaerobic nonclostridial infection. *Vestnik Rossiyskoy Akademii meditsinskikh nauk*. 1996; 2: 41-3. (in Russian).
 16. Akaizin E.S., Kulagin V.F., Slyusar S.G. Rapid diagnosis of pathogens of purulent infection and rapid assessment of the effectiveness of treatment in patients with complicated trauma. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 1997; 2(4): 17-20. (in Russian)
 17. Akaizin E.S., Bulygina V.V. New features rapid diagnosis of pathogens of purulent infection and rapid assessment of the effectiveness of treatment. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1999; 6: 45-7. (in Russian)
 18. Gerasimenko S.S., Shilyayev R.R., Akaizin E.S. Diagnosis of omphalites in newborns taking an anaerobic microflora. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2008. 15(2): 112-3. (in Russian)
 19. Pokrovskiy E.Zh., Stankevich A.M., Akaizin E.S. Diagnostic significance of volatile fatty acids content in blood and abdominal cavity exudate in disseminated peritonitis. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2012; 2: 45-7. (in Russian)
 20. Beloborodova N.V. Integration of human metabolism and its microbiota in critical conditions. *Obshchaya reanimatologiya*. 2012; VIII(4): 42-54. (in Russian).
 21. Mironov A.Yu., Mitrokhin S.D., Ardatskaya M.D., Shevtsov V.V., Zhakot A.N. Diagnostic and prognostic value of various metabolites biosubstrates microflora in patients with lung cancer and COPD. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 9: 83-4. (in Russian)
 22. Mironov A.Yu. Gas chromatography and mass spectrometry in diagnosis anaerobes. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2012; 26: 45-51. (in Russian)
 23. Mironov A.Yu., Zur N.V. Molecular markers of pathogens. [Molekulyarnyye markory patogenov]. M.: OOO Tirazh; 2013. (in Russian)
 24. Ardatskaya M.D., Shevtsov V.V., Zhakot A.N., Fedankov I.N., Mitrokhin S.D., Mironov A.Yu. et al. Metabolites of microflora of different habitats at the diseases of respiratory system. *Ekspirimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya*. 2014; 103(3):46-54 2014; 103(3):46-54. (in Russian)
 25. Zatevalov A.M., Sel'kova E.P., Afanas'yev S.S., Alëshkin A.V., Mironov A.Yu., Gusarova M.P. et al. Assessment of microbiological disorders oropharyngeal and intestinal microflora using methods of mathematical modeling. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(2): 117-21. (in Russian)
 26. Akaizin E.S., Kulagin V.F. Clinical significance of volatile fatty acids examination in wound discharge in patients with complicated trauma and in assessing the effectiveness of treatment. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2017; 4: 57-8. (in Russian)
 27. Hamer H.M. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2008; 27(2): 104-19.
 28. Ursu T.N., CHemodanov V.V., Shnitkova E.V., Akaizin E.S. The peculiarities of motor and evacuator function of digestive tract in neonates. *Prakticheskaya meditsina*. 2012. 5(60): 62-4. (in Russian)
 29. Aleshkin V.A., Afanas'yev S.S., Karaulov A.V., Voropayeva E.A., Afanas'yev M.S., Aleshkin A.V. et al. Microbiocenosis and human health. [Mikrobiotsenozy i zdorov'ye cheloveka]. Moscow: Dinastiya; 2015. (in Russian)
 30. Aleshkin V.A., Sel'kova E.P., Zatevalov A.M., Mironov A.Yu., Volchetskiy A.L., Gudova N.N. Federal clinical guidelines. Determination of dysbiotic changes in the gastrointestinal tract by markers of intestinal contents [Federal'nye klinicheskiye rekomendatsii. Opredeleniye disbioticheskikh izmeneniy zheludochno-kishechnogo trakta po markëram soderzhimogo kishechnika]. Nizhniy Novgorod: Remedium Privolzh'ye; 2016. (in Russian)

Поступила 06.12.18

Принята к печати 12.12.18

Папичев Е.В., Заводовский Б.В., Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Ахвердян Ю.Р.

ФЕТУИН-А. НОВЫЙ ГЕПАТОКИН В ДИАГНОСТИКЕ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА

ФГБНУ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского, 400138, Волгоград, Россия;

Фетуин-А (ФА) (α 2-гликопротеин-Хереман-Шмида) это гепатокин, который обладает многими вариантами биологической активности. Медиатор реально отнести к белкам острофазного ответа, к про- и противовоспалительным медиаторам, к участникам процессов ремоделирования костной ткани. Проведенная нами работа направлена на оценку диагностической роли ФА как нового маркера при ревматоидном артрите (РА). Содержание ФА определяли в сыворотке крови пациентов с РА и здоровых добровольцев, с целью оценки, как нормальных значений ФА, так и выявления взаимосвязи с клиническими проявлениями и активностью патологического процесса. Под наблюдением находилось 140 человек, из которых 110 пациентов с РА, верифицированным на основании критериев EULAR/ACR 2010 и 30 условно здоровых лиц. В группе больных РА 102 женщины и 8 мужчин. Уровень ФА определяли «сэндвич»-методом иммуноферментного анализа, используя коммерческие тест-системы (HUMAN Fetuin-A ELISA BioVendor). Средний уровень ФА в сыворотке крови пациентов с РА составил $765,67 \pm 120,66$ мкг/мл ($M \pm \sigma$), здесь и далее, что достоверно ниже его уровня в группе условно здоровых лиц $812,95 \pm 76,2$ мкг/мл ($p=0,0437$). Статистически значимой разницы средних значений ФА между мужчинами и женщинами не обнаружено ($p=0,424$). Физиологические значения ФА, оцененные как $M \pm 2\sigma$, составили от 653,55 мкг/мл до 972,19 мкг/мл. При РА значимое снижение уровня ФА определено у пациентов позитивных по АЦЦП, с умеренной и высокой активностью заболевания, с рентгенологически определенной стадией заболевания и функциональным классом, наличием внесуставных проявлений и осложнениями. Выявлена умеренная отрицательная корреляционная взаимосвязь между уровнем ФА и такими показателями активности заболевания, как С-реактивный белок, скорость оседания эритроцитов и индекс DAS28. Содержание ФА в сыворотке крови значительно различается в зависимости от клинических проявления заболевания и лабораторных тестов РА. ФА можно обоснованно использовать для диагностики активности, тяжести течения, осложнений и верификации внесуставных проявлений РА.

Ключевые слова: фетуин-А; α 2-Хереман-Шмида гликопротеин; ревматоидный артрит.

Для цитирования: Папичев Е.В., Заводовский Б.В., Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Ахвердян Ю.Р. Фетуин-а. новый гепатокин в диагностике ревматоидного артрита. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (12): 756-760. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-756-760>

Papichev E.V., Zavadovsky B.V., Polyakova Y.V., Seewordova L.E., Akhverdyan Y. R.

FETUIN-A. NOVEL HEPATOKINE IN RHEUMATOID ARTHRITIS LABORATORY DIAGNOSTICS

Federal State Budgetary Institution Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovsky, Volgograd
Fetuin-A (α 2-Heremans-Schmid glycoprotein, AHSG) is a glycoprotein mainly secreted by hepar in adults. It was shown, that AHSG is a positive as well as a negative acute-phase protein with pro- and anti-inflammatory effects. We studied serum levels of an AHSG in patients with rheumatoid arthritis (RA) and healthy controls in order to determine its role in the diagnostics of this disease. We measured serum levels of AHSG in 110 patients with RA and 30 healthy controls. To determine RA phenotype we measured rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies. All patients were examined by the rheumatologist to identify clinical features of RA. Serum CRP and ESR were measured to assess inflammation. Mean level of AHSG in group with RA was $765,67 \pm 120,66$ (Hereinafter $M \pm \sigma$), which was significantly lower than of healthy controls ($812,76,2 \pm 76,2$ $\mu\text{g/ml}$; $p=0,0437$). Insignificant difference of mean levels of AHSG was observed between men and women with RA ($p=0,424$). The reference ranges for AHSG measured from the healthy controls were 653,55-972,19 $\mu\text{g/ml}$ ($M \pm 2\sigma$). We studied mean levels of AHSG according to the clinical and immunological manifestations of RA. AHSG levels were significantly lower within patients positive on ACCP, with moderate or high disease activity, with 2nd, 3rd and 4th x-ray stages and functional classes, with erosivity, extra-articular manifestations and complications. The moderate negative correlation was observed between AHSG level and CRP ($r=-0,3146$; $p<0,001$), ESR ($r=-0,344$; $p<0,001$) and DAS28 ($r=-0,4334$; $p<0,001$). In summary, AHSG mean levels were significantly different in patients with RA. It can be used to improve the diagnostics of RA activity, severity, extra-articular manifestations and complications.

Key words: fetuin-A; AHSG; rheumatoid arthritis.

For citation: Папичев Е.В., Заводовский Б.В., Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Ахвердян Ю.Р. Фетуин-А. Новый гепатокин в ревматоидном артрите лабораторной диагностики. Клиническая лабораторная диагностика (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2018; 63 (12): 756-760 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-756-760>

For correspondence: Папичев Е.В., junior researcher; e-mail: e_papichev@mail.ru

Information about authors:

Папичев Е.В. <https://orcid.org/0000-0002-8799-2991>
Заводовский Б.В. <http://orcid.org/0000-0002-8864-9570>
Сивордова Л.Е. <https://orcid.org/0000-0002-0965-6060>

Ахвердян Ю.Р., <http://orcid.org/0000-0001-8010-6777>
Полякова Ю.В. <http://orcid.org/0000-0002-3022-4166>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 11.09.2018
Accepted 30.09.2018

Для корреспонденции: Папичев Евгений Васильевич, мл. науч. сотр. лаб. методов лечения и профилактики заболеваний суставов; e-mail: E_papichev@mail.ru

Введение. Современным направлением в ревматологии и клинической лабораторной диагностике является поиск новых биологически активных молекул, которые оказывают влияние и отражают активность системного воспалительного процесса [1]. Измерение и определение диагностического значения новых тестов проводят с целью совершенствования диагностики заболевания. Большинство измеряемых протеинов являются локально синтезируемыми клетками медиаторами из групп адипокинов, миокинов и гепатокинов, к которым в последнее время привлечено пристальное внимание клинических биохимиков. Оценка адипокинов показала, что они обладают рядом достоверных диагностических значений. Их общим действием является участие в становлении синдрома резистентности к инсулину, метаболического синдрома, системного воспаления и сердечнососудистых заболеваний. Оценка их диагностического значения при ревматоидном артрите (РА) показала, что некоторые медиаторы из этой группы обладают противовоспалительным действием (адипонектин) [2, 3], иные же – выраженным провоспалительным действием (лептин, резистин и висфатин) [4-6].

Интерес к миокинам продолжается с 1997 г., когда А. McPherron с соавт. [7] выявили наличие миостатина. Для веществ этой группы характерно влияние на многие системы организма и, в частности, на биологическую реакцию воспаления. Так, некоторые миокины стимулируют пролиферацию клеточных элементов в стенке сосудов, повышая их проницаемость (фактор роста эндотелия сосудов, VEGF) при РА [8]; иные медиаторы подавляют деградацию хряща суставных поверхностей (CYR61, cysteine-rich angiogenic inducer 61) [9]. Одним из новых гепатокинов, который может оказывать влияние на патогенез и течение ревматических заболеваний, является фетуин-А (ФА). ФА - это гликопротеин, впервые обнаружен в 1944 г. в бычьей эмбриональной сыворотке крови [10]. Гомолог фетуина-А у человека синтезируют клетки печени. Изначально его именовали как α_2 гликопротеин-Хереман-Шмида, в честь J.F. Heremans и W. Bürgi с K. Schmid; он первым выделил этот протеин [11, 12].

В настоящее время активное выяснение действия ФА на функцию разных органов и систем организма продолжается. Показано, что ФА является негативным белком острой фазы; повышение содержания провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 и ИЛ-6) приводит к снижению содержания ФА. Полагают, что механизм этого действия ассоциирован с изменением структуры белков семейства С/ЕВР (ССААТ-enhancer-binding proteins), которые оказывают влияние на транскрипцию РНК [13]. В свою очередь, в ряде исследований оценено влияние ФА на биологическую реакцию воспаления и показано, что ФА способен предупредить развитие септического процесса. Показана способность ФА стабилизировать мембраны лейкоцитов; происходит это посредством агонистического взаимодействия с катионными полиаминами, блокируя при этом индуцируемый эндотоксинами синтез ИЛ-1 [14, 15]. Другой важной стороной действия ФА является его влияние на процесс минерализации костной ткани. ФА способствует поддержанию оптимального уровня метаболизма в клетках костной ткани. Снижение же содержания его в сыворотке крови сопровождается угнетением процесса ремоделирования костной ткани. В реализации этого дей-

ствия определенное значение придают связыванием ФА белков семейства трансформирующего фактора роста- β (TGF- β), в частности TGF- β 1 и костного морфогенетического протеина (BMP) [16]. Последний, в высокой концентрации, способен угнетать процесс минерализации костной ткани [17].

Кроме сказанного выше, ФА может оказывать опосредованное влияние на развитие синдрома атеросклероза, биологических реакций апоптоза и воспаления [18]. ФА является белковой частью в стабильных коллоидных минерально-протеиновых комплексах, называемых кальцийпротеиновые частицы; в состав их входят дополнительно кальций и соли фосфорных кислот [19]. Выведение этих частиц клетками печени является одним из механизмов поддержания равновесной концентрации кальция в организме [20]. Более того, эти частицы способны быть и переносчиками липидов; это обуславливает влияние на развитие атеросклероза, активности системной биологической реакции воспаления и, как следствие, становление сердечно-сосудистой патологии. Как и адипокины, ФА участвует в формировании метаболического синдрома. ФА блокирует трипсин-активированное аутофосфорилирование рецептора к инсулину, что приводит к становлению синдрома резистентности к инсулину [21]. Более того, уровень ФА значительно повышается при употреблении пищи, богатой липидами; это определяет его влияние на развитие синдрома инсулинорезистентности у пациентов с метаболическим синдромом [22].

В настоящее время обсуждается вопрос об использовании ФА как маркера для лабораторной диагностики при сердечно-сосудистых заболеваниях [23], патологии печени [24], становлении сахарного диабета и его осложнений [25]. Таким образом, ФА обладает биологическим действием на многие системы организма. В связи с изложенным, определение содержания ФА при РА имеет научное и практическое значение. Цель работы - совершенствование лабораторной диагностики РА путем оценки содержания ФА в сыворотке крови.

Материал и методы. С целью диагностики РА определяли уровень ФА в сыворотке крови пациентов с РА и условно здоровых лиц. Обследовано 140 человек: 110 пациентов с РА и 30 условно здоровых лиц, которые составили группу сравнения. Мы сформировали следующие критерии включения: возраст от 18 до 90 лет; наличие симптомов ревматоидного артрита, верифицированного на основании критериев ACR/EULAR 2010; добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: сахарный диабет; наличие злокачественного онкологического заболевания; хроническая болезнь почек (ХБП > С3б). В исследование включены пациенты, которые проходили амбулаторное лечение в консультативно-диагностическом отделении ФГБНУ «НИИ клинической и экспериментальной ревматологии им. А.Б. Зборовского» (г. Волгоград) в течение 2016 - 2018 гг. Все пациенты, которые находились под нашим наблюдением, обследованы одновременно.

Всем пациентам проводили полное клинико-лабораторное обследование: сбор анамнеза, оценка жалоб, клинический осмотр, лабораторные и инструментальные исследования. Комплекс лабораторных методов включал общеклинический анализ крови, определение высокочувствительного С-реактивного белка (вчСРБ),

БИОХИМИЯ

антител к циклическим цитруллинированным пептидам (АЦЦП), ревматоидному фактору (РФ). Содержание ФА в сыворотке крови определяли «сэндвич»-методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест систем (BioVendor HUMAN Fetuin-A ELISA).

Средний возраст больных РА составил 54 года (25% - 47,35; 75% - 61,29 лет). В исследование включены люди трудоспособного возраста. Средний возраст в группе условно здоровых лиц составил 39,4 года (25% - 33; 75% - 45 лет). В группе больных РА было 102 женщины (92,4%) и 8 мужчин (7,58%). По активности РА пациенты распределились следующим образом: в ремиссии ($DAS28 < 2,6$) был 21 человек (19,09%), с низкой степенью активности ($2,6 \leq DAS28 < 3,2$) было 12 человек (10,09%), со средней степенью активности ($3,2 \leq DAS28 < 5,1$) – 67 человек (60,09%), с высокой степенью активности ($DAS28 \geq 5,1$) было 10 пациентов (9,09%).

Статистическая обработка данных клинического обследования проведена с использованием программных пакетов «STATISTICA 10.0 для Windows». Количественные данные обрабатывали статистически с использованием параметрического критерия достоверности Стью-

дента, все группируемые критерии - с использованием ANOVA-тестов, для определения достоверности различий с контрольной группой - post-hoc анализ. Достоверность различий между группами определяли с помощью дисперсионного анализа. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Физиологичный уровень ФА составил от 653,55 мкг/мл до 972,19 мкг/мл, рассчитанный по формуле $M \pm 2\sigma$ в группе условно здоровых лиц. Учитывая, что по данным других авторов высокие значения ФА не оказывали существенной роли на активность воспалительных процессов, все значения ФА свыше 972,19 мкг/мл были включены в группу нормальных значений. Согласно критерию Колмогорова-Смирнова, значения ФА в группе больных РА и условно здоровых лиц подчиняются нормальному распределению ($d=0,083$; $p>0,2$ и $d=0,153$; $p>0,2$ соответственно). Выборочная дисперсия обеих групп является сопоставимой ($F = 2,507$; $p=0,0057$). Средний уровень ФА в группе больных РА ($765,67 \pm 120,66$ мкг/мл, здесь и далее $M \pm \sigma$) и условно здоровых лиц ($812,95 \pm 76,21$ мкг/мл) достоверно различался ($p=0,0437$). Средний уровень фетуина-А у муж-

Таблица 1

Уровень фетуина-А в группе условно здоровых лиц и больных РА.

Клинические проявления	Число больных	Уровень фетуина А, мкг/мл	Достоверность различий в группе больных	Достоверность различий с донорами
По наличию РФ:				
РФ (+)	85	757,08±118,82	$p=0,14$	$p=0,0206$
РФ (-)	25	794,85±124,76		$p=0,5527$
По наличию АЦЦП:				
АЦЦП (+)	74	732,3±118,16	$p<0,001$	$p<0,001$
АЦЦП (-)	36	834,24±95,04		$p=0,412$
По клинической стадии:				
Начальная стадия	16	768,38±95,8	$p=0,746$	$p=0,206$
Развернутая стадия	39	776,51±130,02		$p=0,187$
Поздняя стадия	55	757,19±121,58		$p=0,032$
По степени активности (DAS28):				
Ремиссия	21	843,92±130,73	$p<0,001$	$p=0,289$
Низкая	12	843,57±104,93		$p=0,382$
Умеренная	67	742,37±98,85		$p=0,0021$
Высокая	10	663,9±123,7		$p<0,001$
По системности поражения:				
Суставная форма	88	776,06±124,05	$p=0,042$	$p=0,12$
С внесуставными проявлениями	22	724,1±97,77		$p=0,0053$
По наличию эрозий:				
Эрозивный	87	747,42±113,6	$p=0,00173$	$p=0,00506$
Неэрозивный	23	834,68±124,05		$p=0,47$
По Steinbrocker:				
Стадия I	10	871,96± 116,32	$p<0,001$	$p=0,129$
Стадия II	37	783,43± 106,61		$p=0,259$
Стадия III	54	751,47± 121,28		$p=0,012$
Стадия IV	9	659,72± 70,61		$p<0,001$
По функциональному классу:				
1 класс	26	837,87± 89,2	$p<0,001$	$p=0,378$
2 класс	62	760,27± 126,64		$p=0,026$
3 класс	19	705,76± 89,3		$p<0,001$
4 класс	3	630,67± 55,02		$p=0,0049$
По наличию осложнений:				
Без осложнений	51	803,26±90,99	$p=0,002$	$p=0,7$
С осложнениями	59	733,16±133,8		$p=0,0013$

Таблица 2

Корреляционная взаимосвязь уровня фетуина-А с показателями активности РА.

Показатель активности РА	Взаимосвязь с фетуином-А, г	Уровень достоверности
DAS28	-0,4334	$p < 0,001$
Скорость оседания эритроцитов	-0,344	$p < 0,001$
вч-СРБ (ИФА)	-0,3146	$p < 0,001$

чин и женщин был сопоставим ($M=798,65 \pm 162,8$ мкг/мл и $M=763,07 \pm 117,4$ мкг/мл, соответственно, $F=0,643$; $p=0,424$).

При оценке взаимосвязи уровня ФА с клиническими и лабораторными проявлениями РА были получены данные, представленные в табл. 1.

Достоверное снижение уровня ФА, по сравнению со здоровыми лицами, наблюдали у больных РА, имеющих следующий фенотип заболевания: позитивность по АЦЦП ($p < 0,001$), позитивность по РФ ($p=0,0206$), умеренная ($p=0,0021$) и высокая ($p < 0,001$) степень активности, поздняя клиническая стадия ($p=0,032$), наличие эрозий ($p=0,0051$), III ($p=0,012$) и IV ($p < 0,001$) рентгеновских стадий, 2 ($p=0,026$), 3 ($p < 0,001$) и 4 ($p=0,0049$) функциональных классов, наличие внесуставных проявлений ($p=0,0053$) и осложнений ($p=0,0013$). При проведении внутрigrupпового анализа более низкие уровни ФА выявлены у пациентов с наличием АЦЦП ($p < 0,001$), эрозий ($p=0,00173$), внесистемных проявлений ($p=0,042$) и осложнений (остеопороз, вторичный остеопороз) ($p=0,002$). Анализ дисперсий средних величин показал, что более низкие уровни ФА определены у пациентов с умеренной и высокой степенью активности ($p < 0,001$), II, III и IV рентгеновскими стадиями ($p < 0,001$), 2, 3 и 4 функциональными классами ($p < 0,001$).

Мы проанализировали корреляционную зависимость между уровнями фетуина-А и показателями активности РА (СРБ, СОЭ и индекс активности DAS28). Полученные результаты представлены в табл. 2.

Выявлена умеренная отрицательная корреляционная связь между уровнем фетуина-А и вышеперечисленными показателями с высоким уровнем достоверности ($p < 0,001$).

Обсуждение. РА – одно из самых распространенных ревматических заболеваний. Поиск и изучение новых биомаркеров, отражающих тяжесть РА, способствует совершенствованию методов его диагностики и лечения. Нами был изучен новый гепатокин – фетуин А, который по результатам проведенного исследования можно отнести к негативным белкам острой фазы, так как его уровень обратно коррелировал с такими показателями заболевания как степень активности, длительность и тяжесть патологического процесса. Предполагается, что являясь агонистом для катионных полиаминов, ФА способствует стабилизации мембран лейкоцитов со снижением уровня провоспалительных цитокинов и, как результат, снижением уровня системного воспаления. Вероятно, в условиях гиперергической реакции организма при РА его концентрация оказывается недостаточной для подавления клеточной активности. При этом возрастающие концентрации ФНО- α могут снижать продукцию ФА, что только усугубляет данный «порочный круг». Таким образом, определение

концентрации ФА у больных РА может способствовать улучшению контроля за прогрессированием и активностью данного заболевания.

Заключение. Средний уровень фетуина-А у больных РА был ниже, чем в группе условно здоровых лиц. Отрицательная корреляционная взаимосвязь между показателями активности РА и уровнем фетуина-А подтверждает данные других авторов, которые можно рассматривать как тест, негативный по отношению ко всем позитивным белкам острой фазы. Анализируя взаимосвязь между клиническими показателями РА и уровнем фетуина-А, можно сделать вывод, что на содержание ФА при этом заболевании влияет его длительность и тяжесть патологического процесса. Низкий уровень фетуина-А у пациентов с поздними рентгеновскими, клиническими стадиями, эрозивным поражением и высокими функциональными классами указывает на непосредственную связь прогрессирования заболевания с концентрацией исследуемого гликопротеина. Более того, снижение уровня фетуина-А у пациентов с осложненными формами РА позволяет использовать его в качестве доклинического маркера этих состояний.

Сфера возможного применения результатов исследования. В ходе исследования впервые выявлена взаимосвязь между уровнем фетуина-А и клиническими проявлениями РА. Результаты исследования возможно применить для повышения качества диагностики РА, в частности, для определения активности и тяжести течения заболевания. Но уже на данном этапе возможно использование определение фетуина-А в лабораторной диагностике осложнений, тяжести и длительности РА. Понимание роли фетуина-А в патогенезе РА дает также стимул для создания новых биологических молекул для терапии данного заболевания путем влияния на воспалительный процесс.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 7-25 см. REFERENCES)

- Ахвердян Ю.Р., Заводовский Б.В., Сивордова Л.Е., Павлова А.Б., Симакова Е.С. Определение адипонектина у работников промышленных предприятий с воспалительными заболеваниями суставов. *Медицина труда и промышленная экология.* 2013; 1: 38-41.
- Заводовский Б.В., Сивордова Л.Е., Ахвердян Ю.Р., Полякова Ю.В., Александров А.В., Зборовская И.А. Способ диагностики остеопороза при ревматоидном артрите. Патент РФ № 2015113893; 2015.
- Сивордова Л.Е., Полякова Ю.В., Заводовский Б.В., Симакова Е.С., Фофанова Н.А. Резистин как патогенетический фактор развития остеопороза. *Доктор РУ.* 2013; 6(84): 58-61.
- Ахвердян Ю.Р., Заводовский Б.В., Полякова Ю.В., Сивордова Л.Е., Зборовская И.А. Никотинамид-фосфорибозилтрансфераза как маркер системного воспаления при остеопорозе. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62(10): 606-10.
- Зборовская И.А., Заводовский Б.В., Ахвердян Ю.Р., Кононов В.Е., Симакова Е.С. Прогностическое значение определения уровня лептина у работников промышленных предприятий города Волгограда с остеопорозом. *Медицина труда и промышленная экология.* 2013; 1: 34-8.

REFERENCES

- Andreakos E.T., Foxwell B.M., Brennan F.M. Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future. *Cytokine Growth Factor.* 2002; 13: 299-313.

2. Pavlova A.B., Akhverdyan Yu.R., Simakova E.S., Zavadovskiy B.V., Sivordova L.E. Determination of adiponectin in workers of industrial enterprises with joints inflammatory diseases. *Meditsina truda I promyshlennaya ekologiya*. 2013; 1: 38-41. (in Russian)
3. Zavadovskiy B.V., Sivordova L.E., Akhverdyan Yu.R., Polyakova Yu.V., Aleksandrov A.V., Zborovskaya I.A. Method for diagnosis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. Patent RF № 2015113893; 2015. (in Russian)
4. Sivordova L.E., Polyakova Yu.V., Zavadovskiy B.V., Simakova E.S., Fofanova N.A. Resistin as a pathogenetic factor in the development of osteoarthritis. *Doctor Ru*. 2013; 6(84): 58-61. (in Russian)
5. Akhverdyan Yu.R., Zavadovskiy B.V., Polyakova Yu.V., Sivordova L.E., Zborovskaya I.A. Nicotinamide-phosphoribosyltransferase as a marker of systemic inflammation in osteoarthritis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(10): 606-10. (in Russian)
6. Zborovskaya I.A., Simakova E.S., Zavadovskiy B.V., Akhverdyan Yu.R., Kononov V.E. Prognostic value of determining the level of leptin in workers of industrial enterprises of Volgograd with osteoarthritis. *Meditsina truda I promyshlennaya ekologiya*. 2013; 1: 34-8. (in Russian)
7. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997; 387: 83-90.
8. Afuwape A.O., Kiriakidis S., Paleolop E.M. The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Histol. Histopathol*. 2002; 17: 961-72.
9. Chijiwa M., Mochizuki S., Kimura T., Abe H., Tanaka Y., Fujii Y. et al. CCN1 (Cyr61) Is Overexpressed in Human Osteoarthritic Cartilage and Inhibits ADAMTS-4 (Aggrecanase 1) Activity. *Arthritis Rheum*. 2015; 67(6): 1557-67.
10. Pederson K.O. Fetuin, a new globulin isolated from serum. *Nature*. 1944; 154: 575.
11. Heremans J.F. The globulins of the gamma system of human plasma. *Schweiz Akad. Med. Wiss*. 1961; 17: 119-38.
12. Bürgi W., Schmid K. Preparation and properties of Zn-alpha 2-glycoprotein of normal human plasma. *J. Biol. Chem*. 1961; 236: 1066-74.
13. Wang H., Sama A.E. Anti-inflammatory role of fetuin-A in injury and infection. *Curr. Mol. Med*. 2012; 12: 625-633.
14. Wang H., Tracey K.J. Fetuin opsonizes macrophage-deactivating cations. In: Marshall J.C., Cohen J., eds. Update in Intensive Care and Emergency Medicine: Immune Response in the Critically Ill. *Springer Verlag Press*. 1999; 155-63.
15. Dziegielewska K.M., Andersen N.A., Saunders N.R. Modification of macrophage response to lipopolysaccharide by fetuin. *Immunol. Lett*. 1998; 60(1): 31-5.
16. Demetriou M., Binkert C., Sukhu B., Tenenbaum H.C., Dennis J.W. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein is a transforming growth factor-beta type II receptor mimic and cytokine antagonist. *J. Biol. Chem*. 1996; 271: 12755-61.
17. Binkert C., Demetriou M., Sukhu B., Szweras M., Tenenbaum H.C., Dennis J.W. Regulation of osteogenesis by fetuin. *J. Biol. Chem*. 1999; 274: 28514-20.
18. Pal D., Dasgupta S., Kundu R., Maitra S., Das G., Mukhopadhyay S. et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of Tlr4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat. Med*. 2012; 18: 1279-85.
19. Heiss A., DuChense A., Denecke B., Grötzinger J., Yamamoto K., Renné T. et al. Structural basis of calcification inhibition by alpha 2-HS glycoprotein/fetuin-A: formation of colloidal calciprotein particles. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 13333-41.
20. Kadowaki T., a_в_131Yamauchi T., Kubota N., Hara K., Ueki K., Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest*. 2006; 116(7): 1784-92.
21. Mathews S.T., Chellam N., Srinivas P.R., Cintron V.J., Leon M.A., Goustin A.S. et al. Alpha2-HSG, a specific inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2000; 164: 87-98.
22. Dasgupta S., Bhattacharya S., Biswas A., Majumdar S.S., Mukhopadhyay S., Ray S. NF-kappaB mediates lipid-induced fetuin-A expression in hepatocytes that impairs adipocyte function effecting insulin resistance. *Biochem. J*. 2010; 429: 451-62.
23. Bilgir O., Kebapcilar L., Bilgir F., Bozkaya G., Yildiz Y., Pinar P. et al. Decreased serum fetuin-A levels are associated with coronary artery diseases. *Intern. Med*. 2010; 49(13): 1281-5.
24. Kalabay L., Jakab L., Prohászka Z., Füst G., Benkő Z., Telegdy L. et al. Human fetuin/alpha2HS-glycoprotein level as a novel indicator of liver cell function and shortterm mortality in patients with liver cirrhosis and liver cancer. *Eur. J.Gastroenterol. Hepatol*. 2002; 14(4): 389-94.
25. Ix J.H., Wassel C.L., Kanaya A.M., Vittinghoff E., Johnson K.C., Koster A. et al. Health ABC Study. Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons. *JAMA*. 2008; 300(2): 182-8.

Поступила 11.09.18

Принята к печати 30.09.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.018:577.175.6].06:613.1

Потуткин Д.С.¹, Типисова Е.В.¹, Киприянова К.Е.², Горенко И.Н.¹, Попкова В.А.¹, Елфимова А.Э.¹, Лобанов А.А.³, Попов А.И.³, Андронов С.В.³

УРОВНИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ, ГЛОБУЛИНА, СВЯЗЫВАЮЩЕГО ПОЛОВЫЕ ГОРМОНЫ, АНТИСПЕРМАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ И ДОФАМИНА У КОЧУЮЩИХ, ОСЕДЛЫХ И МЕСТНЫХ ЖИТЕЛЕЙ АРКТИЧЕСКИХ ТЕРРИТОРИЙ В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

¹ФГБУН Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики имени академика Н.П. Лавёрова Российской академии наук, 163000, Архангельск, Россия;

²ГБУК АО «Архангельский краеведческий музей», 163000, Архангельск, Россия;

³ГКУ ЯНАО «Научный центр изучения Арктики», 629730, Салехард, Россия

Позитивные изменения в обществе привели к повышению качества и продолжительности жизни, и как следствие - период менопаузы у женщин продолжается значительно дольше, в связи с чем повышается актуальность изучения гормональных изменений, особенно у представительниц разных групп, проживающих на Арктических территориях. Обследованы 138 женщины коренного (кочующие и оседлые аборигены) и местного европеоидного населения в постменопаузе, постоянно проживающие на Арктических территориях России. Наибольшая разница в изучаемых показателях крови показана между местным европеоидным и аборигенным населением. Больший дисбаланс в содержании дофамина у аборигенов по сравнению с европеоидным населением сочетается с более высоким уровнем пролактина, глобулина, связывающего половые гормоны, антиспермальных антител при более низкой концентрации лютропина, прогестерона, общего и свободного тестостерона. У оседлого аборигенного населения относительно кочующего показан больший процент лиц с низкими уровнями дофамина, лютропина, фоллитропина и высокими значениями пролактина, глобулина, связывающего половые гормоны при нарастании количества обратных связей в системе гипоталамус-гипофиз-гонады, что указывает на более выраженное снижение ее активности. Выраженный дисбаланс в содержании дофамина у аборигенного населения сочетается с отсутствием связей между уровнями дофамина и показателями системы гипоталамус-гипофиз-гонады. Положительные корреляционные связи между содержанием дофамина и лютропина у европеоидного населения свидетельствуют о стимулирующем влиянии дофамина на систему гипоталамус-гипофиз-гонады. Следовательно, снижение активности гонадотропной функции гипофиза у коренного населения Арктики по сравнению с местным европеоидным населением, что в большей степени выражено у оседлого аборигенного населения, а также периферического звена системы гипоталамус-гипофиз-гонады регистрируется на фоне дисбаланса содержания дофамина.

Ключевые слова: Арктика; коренное население; местное население; постменопауза; половые гормоны; дофамин; антиспермальные антитела; глобулин связывающий половые гормоны.

Для цитирования: Потуткин Д.С., Типисова Е.В., Киприянова К.Е., Горенко И.Н., Попкова В.А., Елфимова А.Э., Лобанов А.А., Попов А.И., Андронов С.В. Уровни половых гормонов, глобулина, связывающего половые гормоны, антиспермальных антител и дофамина у кочующих, оседлых и местных жителей арктических территорий в постменопаузе. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; (12): 761-767. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-761-767>

Potutkin D.S.¹, Tipisova E.V.¹, Kipriyanova K.E.², Gorenko I.N.¹, Popkova V.A.¹, Elfimova A.E.¹, Lobanov A.A.³, Popov A.I.³, Andronov S.V.³

LEVELS OF SEX HORMONES, SEX HORMONE BINDING GLOBULIN, ANTISPERM ANTIBODIES AND DOPAMINE IN POSTMENOPAUSAL WOMEN OF NOMADIC AND SETTLED ABORIGINAL AND LOCAL CAUCASOID POPULATIONS OF THE ARCTIC TERRITORIES

¹ N. Laverov Federal Center for Integrated Arctic Research (FCIARctic), 163000, Arkhangelsk, Russia;

² State budgetary institution of culture «Arkhangel'skii kraevedcheskii muzei», 163000, Arkhangelsk, Russia;

³ State institution YNAO «Scientific center of Arctic research», 629730, Nadym, Russia

Positive changes in the society led to an improvement in quality and lifetime; as a result the menopause in women lengthens much longer, in light of this the relevance of studying hormonal changes increases, especially among the representatives of different groups living in the Arctic territories. The study was carried out on 138 women who included nomadic and settled aboriginal and local Caucasoid postmenopausal populations, permanently residing in the Arctic territories of Russia. The greatest difference in the studied blood indicators was shown between the local Caucasoid and aboriginal population. A greater imbalance in the content of dopamine in Aborigines compared with the European population was combined with a higher levels of prolactin, sex hormone binding globulin, antisperm antibodies and with lower concentrations of lutropine, progesterone, total and free testosterone. In the settled aboriginal population compared with nomadic one there were shown the larger proportion of people with low levels of dopamine, lutropine, follitropin and high levels of prolactin, sex hormone binding globulin in the presence of increased number of feedbacks in the hypothalamic-pituitary-gonadal system, which suggested more pronounced reduction of its activity. The evident imbalance of the dopamine content in the aboriginal population was combined with the absence of connections between dopamine level and the parameters of the hypothalamic-pituitary-gonadal system. Positive correlation between the contents of dopamine and lutropin in the European population suggested the stimulating effect of dopamine on the hypothalamic-pituitary-gonadal system. Affected by imbalanced dopamine content the decreased activity of gonadotropic pituitary gland function as well as the peripheral part of the hypothalamic-pituitary-gonadal system was registered in the aboriginal Arctic population in comparison with the local European one, which was more pronounced in the settled aborigines.

Для корреспонденции: Типисова Елена Васильевна, д-р биол. наук, зав. лаб. эндокринологии имени проф. А.В. Ткачева, e-mail: tipisova@rambler.ru

К е у о р д с : *Arctic; aboriginal population; local population; postmenopause; sex hormones; dopamine; antisperm antibodies; sex hormone binding globulin.*

For citation: Potutkin D.S., Tipisova E.V., Kipriyanova K.E., Gorenko I.N., Popkova V.A., Elfimova A.E., Lobanov A.A., Popov A.I., Andronov S.V. Levels of sex hormones, sex hormone binding globulin, antisperm antibodies and dopamine in postmenopausal women of nomadic and settled aboriginal and local caucasoid populations of the arctic territories. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (12): 761-767 (in Russ.).
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-761-767>

For correspondence: Tipisova E.V., doctor of biology (PhD), head of laboratory of endocrinology named after prof. A.V. Tkachev; e-mail: tipisova@rambler.ru

Information about authors:

Potutkin D.S., <https://orcid.org/0000-0002-9738-7517>
Kipriyanova K.E., <http://orcid.org/0000-0002-7687-7082>
Popkova V.A., <http://orcid.org/0000-0002-0818-7274>
Lobanov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-6615-733X>
Andronov S.V., <http://orcid.org/0000-0002-5616-5897>

Tipisova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-2097-3806>
Gorenko I.N., <http://orcid.org/0000-0003-3097-9427>
Elfimova A.E., <http://orcid.org/0000-0001-9908-7107>
Popov A.I., <http://orcid.org/0000-0002-0614-8116>

Acknowledgment. *The study was carried out in accordance with the R&D financing plan of the FCIARctic on the topic "Determination of the modulating effect of the blood content of catecholamines on the hormonal profile in humans and hydrobionts of the European North" (state number AAAA-A15-115122810188-4).*

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

Received 12.12.2018
Accepted 20.12.2018

Введение. В постановлении правительства РФ от 21 апреля 2014 г. № 366 «Социально-экономическое развитие Арктической зоны Российской Федерации на период до 2020 года»¹ и поправках к этому постановлению от 31 августа 2017 г. №1064² одними из важных моментов реализации программы являются: улучшение качества жизни населения, проживающего и работающего в Арктической зоне Российской Федерации (АЗРФ), что возможно за счёт выяснения механизмов адаптационных перестроек северных народов, меняющих свой уклад жизни, и улучшения понимания населением необходимости заботы о своем здоровье.

Известно, что менопауза является критическим периодом в жизни женщины: за счет выключения эстрогенпродуцирующей функции яичников увеличивается риск развития метаболических нарушений [1], нарушений ремоделирования костной ткани [2], атеросклеротических изменений в сердечно-сосудистой системе [3] и др. По данным Росстата, с 1998 по 2016 г. в Архангельской области и НАО имеется тенденция к снижению уровня смертности, и можно говорить об увеличении числа людей старше трудоспособного возраста. В итоге, с увеличением продолжительности, время нахождения женщин в периоде постменопаузы также увеличилось, а отодвигание сроков наступления пенсионного возраста, приводит к увеличению длительности совпадения работоспособного периода и периода нахождения в постменопаузе, который крайне негативно сказывается на качестве жизни и на фактической работоспособности [4]. Кроме того, условия проживания на Севере с постоянным воздействием ряда неблагоприятных климатогеографических факторов на механизмы гомеостаза [5-7],

приводят к быстрому истощению адаптационных резервов всех систем организма [5]. Это проявляется ранним старением [8], развитием специфических «северных» заболеваний [6, 9] и повышенной смертностью [6], высокой распространенностью репродуктивных патологий [10], наличием сезонных пиков фертильности [9], нарушением менструальной функции [9] и значительном проценте самопроизвольного прерывания беременности [11]. По данным ряда авторов [9-11] у женщин на Севере старение и развитие дистрофических изменений репродуктивной системы (климактерические изменения и менопауза) наступает несколько раньше, чем в центральной и южной полосах России.

По данным исследований [10, 12], состояние здоровья неоднородно у различных групп женщин, проживающих на Севере: местного европеоидного, кочующего и оседлого аборигенного населения. Это связано с особенностями быта, питания, предпочтением или пренебрежением к здоровому образу жизни [12, 13], а также с длительностью проживания различных популяционных групп в экстремальных климатических условиях [9, 10]. Ранние исследования гормональных показателей репродуктивной системы у постменопаузальных женщин Заполярья проводились без учета кочующего и оседлого образа жизни [9, 14].

Есть сведения о повышении эстрадиолом синтеза дофамина в нейронах мозга [15], а также о влиянии дефицита эстрогенов на снижение количества рецепторов дофамина D-1 и D-2 в коре мозга у мышей после овариэктомии [16]. Снижение выработки прогестерона, андрогенов и эстрогенов у женщин приводит к нарушению работы различных структур мозга, снижению синтеза многих нейро-трансммиттеров (в том числе дофамина) и приводит к избыточному синтезу пролактина (синтез которого также может повышаться при стрессе) и, ещё большему снижению выработки эстрогенов [17]. Дофаминергические нейроны, изменяя секрецию пролактостатина и пролактолиберина, тиролиберина в гипоталамусе, тормозят выработку гипофизом пролактина и тиреотропного гормона [15].

¹ Об утверждении государственной программы Российской Федерации "Социально-экономическое развитие Арктической зоны Российской Федерации на период до 2020 года". Постановление Правительства РФ от 21 апреля 2014 г. № 366.

² О внесении изменений в постановление Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2014 г. № 366: постановление Правительства РФ от 31 августа 2017 г. № 1064. - 139 стр.

Таким образом, содержание гормонов системы гипоталамус-гипофиз-гонады, антиспермальных антител и глобулина, связывающего половые гормоны, а также дофамина у жительниц территорий Арктической зоны РФ, находящихся в постменопаузе, в зависимости от принадлежности к коренному либо местному европеоидному населению и образа жизни (кочевой, оседлый) исследовано в недостаточной мере. К тому же, сейчас мало учитывается факт реадaptации представителей малочисленных коренных народов при смене образа жизни и переходе от кочевничества к оседлости, влекущий за собой и смену типа питания [13].

Материал и методы. Проведено аналитическое поперечное неконтролируемое исследование. В работе приведены данные по экспедициям 2009 - 2016 гг., все они проводились в весенний период, в марте и апреле. Было обследовано 138 женщин в постменопаузе, проживающих на территории Арктической зоны РФ. Испытуемые проживали как на Европейском Севере (дер. Сояна (65°46' с.ш.), дер. Совполье (65°17' с.ш.) и дер. Долгощелье (66°05' с.ш.) Мезенского района, пос. Нельмин Нос (67°58' с.ш.) НАО), так и на территории Ямало-Ненецкого автономного округа (г. Надым (65°32' с.ш.) Надымского района, с. Се-Яха (70°10' с.ш.) Ямальского района, п. Гыда и п. Тазовский (70°53' с.ш. и 67°27' с.ш. соответственно) Тазовского района). Все представительницы коренного населения самоидентифицировали себя как ненки, однако, принимая во внимание высокую степень метисации с иными представителями коренных народностей (например, коми) и европеоидным населением [18], мы считаем более корректным употребление термина «аборигенное население». Среди обследуемых были выделены следующие группы: кочующее аборигенное население - 21 человек (КА), оседлое аборигенное население (ОА) - 69 человек и местное русское население, проживающее на исследуемой территории в течение трёх и более поколений (МЕ) - 48 человек.

Все обследуемые прошли анкетирование с целью определения состояния здоровья, социально-экономических условий проживания, были осмотрены врачом. Исключались лица, имеющие эндокринные патологии (сахарный диабет, патологии щитовидной железы), а также находящиеся в стадии обострения соматической патологии либо постоянно принимающие лекарства. В период с 8.30 до 11.00 у испытуемых производили забор крови из локтевой вены натощак с помощью вакуумных пробирок «Improvacuter» с активатором свертывания SiO₂ (для сыворотки) и с ЭДТА (для плазмы). Полученные образцы центрифугировали и подвергали заморозке при температуре -20°C. Взятие крови, подготовка и хранение сыворотки и плазмы крови проводились согласно ГОСТ Р 52623.4-2015, п.9 и ГОСТ Р 53079.4-2008.

При помощи планшетного автоанализатора для ИФА ELISYS Uno (Human GmbH, Германия) в сыворотке крови определяли уровни лютропина (ЛГ), фоллитропина (ФСГ), пролактина, прогестерона, глобулина связывающего половые гормоны (ГСПГ) - наборами фирмы «Хема-Медика» (Россия), свободного тестостерона, эстрадиола и антиспермальных антител (АСА) - наборами фирмы «DRG» (Германия), дегидроэпандростерон-сульфата (ДГЭА-С) - наборами фирмы «Алкор Био» (Россия). В плазме крови определяли уровни дофамина наборами фирмы «Labor Diagnostika Nord» (Германия) и циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) наборами

производства «Immunotech» (Франция).

Математическая и статистическая обработка проводилась с использованием программных средств Microsoft Office 2010 и Statistica 10.0. Используя критерий Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk test), был проведен анализ нормальности распределения признаков и анализ равенства дисперсий. По их результатам, а также учитываемая малые объемы выборок, все дальнейшие процедуры статистического анализа проводились с применением непараметрических методов обработки. Выявление значимости различий проводилось при помощи U-критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Для отображения результатов сравнения выбраны значения Медианы, 10 и 90 перцентилей, далее записанных в виде - Me (10%; 90%), 95% доверительного интервала (95% CI). Различия считались статистически значимыми при величине вероятности ошибочного принятия нулевой гипотезы о равенстве медиан $p \leq 0,05$. Значения p от 0,05 и до 0,1 включительно – расценивались как тенденция. Также использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена (Spearman rank correlation coefficient). За нормативные значения принимались нормы из соответствующих коммерческих наборов, приведенные для женщин в постменопаузе.

Результаты. Значимых возрастных различий в исследуемых группах не выявлено. Отмечено статистически значимое различие в показателе индекса массы тела (ИМТ) между группами кочующих аборигенов 39,19 (30,77; 65,34) ед. и местным европеоидным населением 30,95 (22,54; 36,93) ед. при значении $p < 0,001$.

Наибольшее количество различий между уровнями эндокринных показателей репродуктивной системы у постменопаузальных женщин АЗРФ было выявлено в группе местного европеоидного населения по сравнению с аборигенным населением, различия в группах кочующих и оседлых женщин минимальны (табл. 1).

Диапазон колебания концентраций ЛГ у аборигенного населения был существенно ниже по сравнению с местным европеоидным населением, его фактические уровни в группе оседлых аборигенов значимо ниже, чем в группе местного европеоидного населения. Также наблюдалась тенденция к наличию статистически значимых различий значений ЛГ между группами МЕ и КА. Содержание ФСГ существенно не различалось в исследуемых группах, однако, у 10% кочевых и 20,69% оседлых аборигенов его значения были ниже границ нормы и отмечена статистическая значимость различий ($p = 0,021$) по количеству превышающих норму значений в группе ОА по отношению к группе МЕ.

У обеих групп аборигенного населения были показаны статистически значимо более высокие уровни пролактина по сравнению с группой местного европеоидного населения. Та же закономерность отмечалась для антиспермальных антител и для ГСПГ. В процентном отношении у 29,41% кочующих, 47,92% оседлых аборигенов, и 13,33% местных европеоидов значения ГСПГ были выше нормы, притом между группами ОА и МЕ уровень статистической значимости различий числа людей с превышающими норму значениями был равен 0,017. Высокие уровни пролактина регистрировали у 5% кочующих и 10,34% оседлых аборигенов.

Уровни общих фракций тестостерона у обследованных женщин – аборигенных жителей принимали значения, близкие к нижним границам норм у оседлых или выходили за их пределы у 4% кочевых аборигенов. У

Уровни половых гормонов, глобулина связывающего половые гормоны, антиспермальных антител, дофамина и цАМФ в крови у жительниц Севера в постменопаузе.

Название гормона - (нормальные значения)	Местное европеоид- ное население (1)	Кочующие aborигены (2)	Оседлые аборигены (3)	Значения <i>p</i>
	Me (10%; 90%) (95 CI%)	Me (10%; 90%) (95 CI%)	Me (10%; 90%) (95 CI%)	
Возраст, годы	57,5 (50,4; 70,6) (54; 59)	56 (48; 65) (53; 57)	56 (49; 67) (56,38; 56,9)	
Лютропин (ЛГ) (5,0-57,0 МЕ/л)	24,61 (11,12; 38,51) (18,54; 29,8)	20,68 (8,76; 29,53) (15,41; 24,92)	20,05 (5,38; 34,03) (15,68; 23,06)	1-2 = 0,092 (*) 1-3 = 0,045
Фоллитропин (ФСГ) (10-150 МЕ/л)	44,82 (27,29; 77,87) (33,62; 49,44)	50,01 (9,81; 86,99) (31,81; 65,9)	59,34 (5,08; 91,96) (41,39; 72,54)	
Пролактин (1,9-26,4 нг/мл)	9,44 (5,07; 17,42) (6,46; 11,94)	12,58 (6,89; 21,69) (9,52; 15,98)	12,63 (7,42; 26,39) (9,67; 15,59)	1-2 = 0,041 1-3 = 0,009
Прогестерон (0-2,3 нмоль/л)	6,14 (3,58; 10,87) (4,62; 6,47)	3,64 (1,53; 7,87) (2,29; 4,43)	3,99 (1,79; 7,78) (3,41; 4,49)	1-2 = 0,008 1-3 = 0,001
Эстрадиол (0,07-0,23 нмоль/л)	0,156 (0,092; 0,363) (0,15; 0,18)	0,196 (0,097; 0,783) (0,122; 0,208)	0,15 (0,089; 0,27) (0,124; 0,189)	
Тестостерон общий (0,5-4,3 нмоль/л)	1,79 (0,89; 2,59) (1,35; 1,85)	1,04 (0,45; 2,2) (0,71; 1,46)	0,94 (0,51; 2,38) (0,87; 1,13)	1-2 = 0,008 1-3 = 0,001
Тестостерон свободный (< 55 лет - 0,0-2,9, > 55 лет - 0,0-1,6 пг/мл)	1,57 (0,32; 5,19) (0,85; 2,17)	0,65 (0,17; 1,48) (0,2; 1)	0,75 (0,18; 2,31) (0,58; 0,93)	1-2 = 0,005 1-3 = 0,010
Дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭА-С) (0,27-6,75 мкмоль/л)	3,57 (1,31; 6,09) (2,24; 5,61)	2,54 (1,67; 7,32) (1,79; 5,69)	5,45 (1,52; 8,78) (3,37; 5,74)	
Глобулин связывающий половые гормоны (ГСПГ) (15-120 нмоль/л)	53,13 (18,8; 142,35) (38,8; 63,22)	85,05 (49,76; 367,16) (67,35; 117,23)	106,41 (46,83; 279,5) (81,1; 176,29)	1-2 = 0,007 1-3 = 0,001
Антиспермальные антитела (АСАТ) (0-60 МЕ/л)	20,41 (8,52; 29,37) (14,54; 24,24)	40,8 (29,43; 47,6) (33,85; 46,5)	39,2 (27,98; 53,28) (36,9; 43,8)	1-2 = 0,001 1-3 = 0,001
Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) (17-36 нмоль/л)	21,91 (16,19; 28,57) (17,69; 23,3)	19,25 (14,59; 34,74) (17,05; 21,67)	22,74 (16,1; 28,39) (16,17; 25,41)	
Дофамин (<0,653 нмоль/л)	0,402 (0,029; 0,581) (0,313; 0,519)	0,399 (0,004; 1,907) (0,152; 0,488)	0,278 (0,000; 0,721) (0,095; 0,363)	1-3 = 0,099 (*)

Примечание. (*) - тенденция, уровень статистической значимости различий в интервале от 0,05 до 0,1.

аборигенов, по сравнению с местным европеоидным населением выявлено статистически значимо более низкое содержание общего и свободного тестостерона. В процентном отношении у кочевых аборигенов не было отмечено, чтобы концентрации свободного тестостерона превышали нормативные значения, однако это было отмечено у 6,82% оседлых аборигенов и 38,09% местных европеоидов. Это различие по количеству превышающих норму значений в группе МЕ по отношению к группе КА, и МЕ по отношению к ОА, имело статистическую значимость ($p = 0,011$ и $p = 0,002$ соответственно).

Значения прогестерона у аборигенного населения были статистически значимо ниже, чем у местного европеоидного населения, при том, у 79,59% ОА, 68,75% КА и 95,65% МЕ значения его концентраций были выше установленных в наборах нормативных значений, показывая статистическую значимость различий ($p = 0,022$)

по количеству высоких значений между МЕ и КА. Значения концентраций ДГЭА-С не показали статистически значимых различий между изучаемыми группами. Содержание эстрадиола у обследованных групп населения статистически не различалось, однако выходило за пределы верхних границ нормы (у 25% КА, 18% ОА и 11,36% МЕ), при этом наиболее широкий диапазон колебаний данного гормона отмечался у кочующего аборигенного населения, а наименьший - у оседлого населения. Содержание эстрадиола у ОА приближалось по значениям к его уровню у МЕ. Концентрации цАМФ статистически не различались между изучаемыми группами.

Содержание дофамина в крови выходило за рамки верхненормативных значений у аборигенного населения (у 29,41% КА, 18,92% ОА и 6,25% МЕ), при этом количество нулевых значений также было велико (17,65%

Таблица 2

Значения коэффициентов корреляции между уровнями показателей системы гипоталамус-гипофиз-гонады, антиспермальных антител и дофамина в крови у женского населения постменопаузального возраста.

Сравниваемая пара показателей	Местное европеоидное население (МЕ)		Кочующие аборигены (КА)		Оседлые аборигены (ОА)	
	R	p	R	p	R	p
ЛГ - ФСГ	0,558	0,007	0,665	0,001	0,714	0,001
ЛГ - Своб. тестостерон	-0,103	0,666	-0,236	0,437	-0,375	0,012
ЛГ - Эстрадиол	0,258	0,246	-0,116	0,680	-0,387	0,006
ЛГ - ДГЭА-С	0,093	0,722	-0,077	0,803	-0,407	0,003
ЛГ - Дофамин	0,524	0,045	-0,092	0,700	-0,262	0,099
ФСГ - Общ. тестостерон	-0,172	0,443	-0,682	0,005	-0,408	0,003
ФСГ - Своб. тестостерон	-0,164	0,490	-0,615	0,025	-0,354	0,018
ФСГ - Эстрадиол	0,181	0,421	-0,341	0,213	-0,342	0,015
ФСГ - ДГЭА-С	-0,049	0,852	-0,203	0,505	-0,348	0,012
ФСГ - АСАТ	-0,188	0,442	0,610	0,027	-0,135	0,366
Пролактин - Эстрадиол	-0,255	0,251	0,667	0,007	-0,195	0,176
Прог. - Общ. тестостерон	0,304	0,158	-0,138	0,610	0,417	0,003
Прог. - Своб. тестостерон	0,486	0,025	0,555	0,049	0,497	0,001
Прог. - ГСПГ	-0,620	0,014	0,124	0,649	-0,013	0,935
Прог. - ДГЭА-С	0,671	0,002	0,599	0,031	0,542	0,001
Общ. тест. - Своб. тест.	0,619	0,003	0,527	0,064	0,707	0,001
Общ. тест. - ДГЭА-С	0,311	0,209	0,038	0,901	0,607	0,001
Общ. тест. - АСАТ	0,474	0,040	-0,714	0,006	-0,041	0,788
Своб. тест. - ДГЭА-С	0,806	0,001	0,687	0,010	0,639	0,001
Эстрадиол - ДГЭА-С	0,190	0,449	0,333	0,266	0,429	0,002
Эстрадиол - АСАТ	0,006	0,980	-0,437	0,135	0,410	0,005
ГСПГ - АСАТ	-0,221	0,428	-0,066	0,831	0,386	0,008
ГСПГ - Дофамин	0,519	0,048	0,124	0,648	0,066	0,724
АСАТ - Дофамин	-0,821	0,001	0,254	0,402	0,180	0,331

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые связи.

у КА; 37,84% у ОА и 18,75% у МЕ). Не было отмечено статистической значимости различий между тремя обследуемыми группами, однако, на уровне тенденции (при $p = 0,099$) были отмечены различия в концентрации дофамина между группами местных европеоидных жительниц и группой оседлых аборигенов, где его значения были ниже.

При анализе корреляционных взаимодействий между уровнями исследуемых показателей (табл.2) было выявлено, что у кочующих аборигенов максимальное количество статистически значимых корреляций (4 из 9) было образовано с ФСГ. Из них две положительные связи с

АСАТ и ЛГ и две отрицательные с общим и свободным тестостероном. Значимых связей с дофамином отмечено не было. В группе оседлых аборигенов обнаружилось наибольшее количество корреляций (17) по сравнению с КА и МЕ, при этом с концентрациями ДГЭА-С и свободного тестостерона обнаружено по 5 связей, ФСГ, ЛГ по 4 связи. При этом, с гипофизарными гормонами регистрировались отрицательные связи. У местных европеоидных женщин в постменопаузе (10 связей) максимум связей выявлено с уровнями в крови дофамина, прогестерона и свободного тестостерона. Дофамин образует положительные корреляционные связи с содержанием ЛГ и ГСПГ, и одну отрицательную связь - с концентрацией в крови АСАТ.

Обсуждение. В течение XX века у представителей коренных народов начал происходить переход к оседлому образу жизни [19], однако данный период сравнительно мал по отношению к времени проживания аборигенной популяции на данной территории. Поскольку аборигенное и местное европеоидное население, многие поколения вели весьма несходный образ жизни, несмотря на однородные климатические условия, различия в уровнях гормонов у женщин данных популяций являются закономерными. Это обуславливает сходство эндокринных параметров репродуктивной системы в постменопаузе у представительниц кочующего и оседлого коренного населения и большое количество различий по сравнению с европеоидными женщинами.

Различия гормональных показателей между группами аборигенного и европеоидного населения указывают на большее напряжение гипофизарных звеньев регуляции при снижении активности периферического звена системы гипоталамус-гипофиз-гонады у коренных жителей. Так, отмеченные у представительниц групп аборигенов по отношению к МЕ повышенные значения пролактина, а также более низкие уровни ЛГ и прогестерона, общего и свободного тестостерона на фоне увеличения содержания ГСПГ, возможно, связаны с компенсаторным вовлечением в регуляцию энергообмена щитовидной железы, активность которой более высока у аборигенного населения [20]. Тиреолиберин в некоторых случаях может связываться с рецепторами пролактолиберина и дополнительно стимулировать выработку пролактина, а он в свою очередь снижает уровень гонадолиберина (ГНРГ), повышающих секрецию в большей степени ЛГ и в меньшей ФСГ [17]. Данная схема взаимодействия частично объясняет более низкий уровень пролактина в сочетании с более высоким содержанием ЛГ у местных европеоидов и более низкие уровни ЛГ при более высоких значениях пролактина у коренного населения. Снижение уровней ЛГ у аборигенного населения, соответственно физиологическим механизмам регуляции в системе гипоталамус-гипофиз-гонады, приводит к более низким значениям общего тестостерона по сравнению с европеоидным населением.

Дофамин оказывает дозозависимое воздействие на синтез и секрецию ГНРГ [21], вызывая изменение содержания в крови ЛГ. Выявленные нами положительные взаимосвязи уровней дофамина и ЛГ у местного европеоидного населения сочетаются с минимальными отклонениями уровней дофамина от пределов нормативных показателей, что может указывать на стимулирующий эффект референсных уровней дофамина на ГНРГ и, соответственно, стероидогенез. Напротив, более низкое содержание ЛГ, прогестерона, общих и свободных фрак-

ций тестостерона у аборигенного населения сочетается с выявлением выраженного дисбаланса в содержании дофамина с регистрацией высоких его значений у кочующего населения и низких – у оседлого аборигенного населения, что сочетается с отсутствием корреляционных взаимосвязей между уровнями дофамина и гормонов.

Более низкие концентрации свободного тестостерона у аборигенных жителей по отношению к местным европеоидам можно объяснить повышением значений ГСПГ, и возможно связано с потребностью в большем депонировании и транспорте половых стероидов. Низкий уровень тестостерона может быть также связан с его ароматизацией до эстрогенов в жировой ткани [17], количество которой у коренного населения по отношению к местным европеоидам согласно значениям ИМТ повышено. Это, скорее всего, обусловлено изменением питания аборигенного населения, замещением традиционной белковой и жирной пищи на высокоуглеводную [13].

Относительно содержания в крови прогестерона отмечено его повышение у местного европеоидного населения по отношению к норме в среднем в 2,5 раза, у аборигенного населения – в 1,5 раза, что может быть обусловлено повышенной потребностью в нём организма или нарушением синтеза или работы ферментов, превращающими его в другие активные метаболиты. Вполне вероятно, что уровень прогестерона повышен ввиду высокого содержания холестерина у жителей Севера [13] как субстрата для производства стероидных гормонов.

Отмеченные различия по уровню антиспермальных антител между группой местного европеоидного населения и аборигенами, у которых значения были выше в два раза, можно объяснить окислительным стрессом [13], повреждением эндотелия капилляров активными метаболитами кислорода [6], что приводит к повышению содержания в крови слущенных эндотелиоцитов, фрагментов и содержимого клеток, и вызывает иммунные реакции.

Между группами кочующего и оседлого аборигенного населения регистрировали некоторые различия в активности системы гипоталамус-гипофиз-гонады, а именно, выявление большего процента лиц с низкими значениями уровней ЛГ и ФСГ, что сочеталось с увеличением процента лиц с высоким уровнем пролактина и ГСПГ у оседлого населения. Схожие особенности состояния системы гипоталамус-гипофиз – гонады у аборигенного населения наблюдали среди мужского населения Арктики с регистрацией высокого содержания ГСПГ, антиспермальных антител при дисбалансе гипофизарных и периферических гормонов, что в большей степени характерно для оседлого аборигенного населения [22].

Следовательно, снижение активности гонадотропной функции гипофиза у коренного населения Арктики по сравнению с местным европеоидным населением, что в большей степени выражено у оседлого аборигенного населения, а также периферического звена системы гипоталамус-гипофиз-гонады на фоне регистрации дисбаланса содержания дофамина сочетается с повышением концентрации пролактина, ГСПГ и антиспермальных антител в крови. Полученные в ходе исследования данные будут являться основой для разработки профилактических мероприятий, препятствующих развитию преждевременного старения, разработке мер, нивелирующих негативное воздействие «выпадения» гонадной функции у постменопаузальных женщин, проживающих

на территории АЗРФ, и, следовательно, профилактике развития связанных с менопаузой патологий.

Выводы:

1. У аборигенного женского населения постменопаузального возраста показан больший дисбаланс в содержании дофамина по сравнению с европеоидным населением, что связано с отсутствием корреляционных связей между уровнем дофамина и показателями системы гипоталамус-гипофиз-гонады.

2. У аборигенного населения регистрируется более высокое содержание в крови пролактина, глобулина, связывающего половые гормоны, и антиспермальных антител при более низком содержании лютропина, прогестерона, общего и свободного тестостерона по сравнению с местным европеоидным населением, у которого регистрировали положительные корреляции дофамина с лютропином.

3. Отличительными признаками между кочующими и оседлыми аборигенами является увеличение доли лиц с низкими значениями дофамина, лютропина, фоллитропина на фоне нарастания лиц с высокими уровнями пролактина, глобулина, связывающего половые гормоны, у оседлого населения при регистрации большого количества обратных связей в системе гипоталамус-гипофиз-гонады.

Финансирование. Работа выполнена в соответствии с планом ФНИР ФГБУН ФИЦКИА РАН по теме «Выяснение модулирующего влияния содержания катехоламинов в крови на гормональный профиль у человека и гидробионтов Европейского Севера» (номер гос. регистрации АААА-А15-115122810188-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 21 см. REFERENCES)

1. Бобылева И.В. Характер обменно-эндокринных нарушений у женщин при естественной и хирургической менопаузе. *Бюллетень медицинских Интернет-конференций*. 2015; 5(4): 219-21.
2. Эсдова А.Э., Хашаева Т.Х.-М., Абусуева З.А., Гамзаев А.К., Идрисова М.А., Махтибекова П.А. Маркеры костного ремоделирования и кальций-фосфорного обмена у женщин с остеопенией на фоне инсулиннезависимого сахарного диабета в постменопаузе. *Вестник Дагестанской государственной медицинской академии*. 2015; 2 (15): 30-4.
3. Николенко Л.А., Алёхин Д.И., Николенко Е.С. Постменопауза, метаболический синдром и ИБС (обзор литературы). *Проблемы репродукции*. 2015; 21(3): 117-21.
4. Ильина Л.М., Юренина С.В., Дубровина А.В., Эбзиева З.Х. Влияние менопаузы на работающих женщин: фактор, которому не придается должного значения. *Проблемы репродукции*. 2016; 22(1): 87-94.
5. Громова Г.Г., Бурмасова А.В. Адаптация организма человека к условиям Крайнего Севера. В кн.: Материалы II Всероссийской научно-практической конференции «Север России: стратегии и перспективы развития». Сургут; 2016: 89-98.
6. Хаснулин В.И., Хаснулин П.В. Современные представления о механизмах формирования северного стресса у человека в высоких широтах. *Экология человека*. 2012; 1: 3-11.
7. Дёмин Д.Б., Поскотинова Л.В., Кривоногова Е.В. Возрастные особенности функциональных показателей сердечно-сосудистой системы у подростков различных арктических территорий. *Экология человека*. 2015; 7: 27-32.
8. Юрьев Ю.Ю., Типисова Е.В. Возрастные аспекты эндокринного статуса у мужчин-постоянных и приезжих жителей города Архангельска. *Экология человека*. 2009; 7: 15-9.
9. Ткачев А.В., Бойко Е.Р., Губкина З.Д., Раменская Е.Б., Суханов С.Г. Эндокринная система и обмен веществ у человека на Севере. Сыктывкар: Коми научный центр УрО Российской академии наук; 1992.

10. Красовицкий Р.А., Тетелютин А.О., Гасников К.В., Бушмелева Н.Н., Давтян К.А. Медико-социальные аспекты сохранения соматического и репродуктивного здоровья у женщин финно-угорской группы. *Медицинский альманах*. 2011; 3(16): 31-4.
11. Губкина З.Д. О тенденциях изменения норм физического и полового развития у женского населения заполярных районов Архангельской области. В кн.: Солонин Ю.Г., ред. Физиологические закономерности гормональных, метаболических, иммунологических изменений в организме человека на Европейском Севере. Сыктывкар: Труды Коми научного центра УрО РАН; 1997: 44-70.
12. Захарова Т.Г., Кашина М.А., Захаров Г.Н. Зависимость репродуктивного здоровья женщин коренных народов Крайнего Севера от уклада жизни. *Земский врач*. 2012; 3: 47-50.
13. Даренская М.А. Особенности метаболических реакций у коренного и пришлого населения Севера и Сибири. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2014; 2(96): 97-103.
14. Типисова Е.В., Киприянова К.Е., Елфимова А.Э., Горенко И.Н. Изменение уровня гормонов в сыворотке крови у жителей Архангельска в пожилом и старческом возрасте с учетом пола. *Успехи геронтологии*. 2015; 28(4): 713-7.
15. Циркин В.И., Багаев В.И., Бейн Б.Н. Роль дофамина в деятельности мозга (обзор литературы). *Вятский медицинский вестник*. 2010; 1: 7-18.
16. Валева Л.А., Харчилава О.М. Роль дофаминовых рецепторов в патогенезе менопаузального синдрома и механизме действия женских половых гормонов. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2007; 2(6): 34-8.
17. Леонова З.А., Флоренсов В.В. Синтез и функции женских половых гормонов. *Сибирский медицинский журнал*. 2013; 2: 10-3.
18. Волжанина Е.А. Влияние этнически смешанных семей на численность ненцев, проживающих на территории ямало-ненецкого автономного округа, в конце XX начале XXI в. *Вестник археологии, антропологии и этнографии*. 2008; 8: 127-39.
19. Волжанина Е.А. Численность, расселение и традиционное хозяйство Вынгапуровских ненцев в условиях промышленного освоения. *Вестник археологии, антропологии и этнографии*. 2010; 1(12): 174-83.
20. Типисова Е.В., Киприянова К.Е., Горенко И.Н., Лобанов А.А., Попов А.И., Андронов С.В. и др. Содержание дофамина и гормонов системы гипофиз-щитовидная железа в крови у кочующего, оседлого и местного населения Арктики. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(5): 291-6.
22. Типисова Е.В., Горенко И.Н., Попкова В.А., Попов А.И., Андронов С.В. Соотношение дофамина, половых гормонов, антиспермальных антител, секс-стероид-связывающего глобулина, cAMP у коренного и местного мужского населения Арктической Зоны РФ. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2018; 15(2): 218-28.
6. Khasnulin V.I., Khasnulin P.V. Modern concepts of the mechanisms forming northern stress in humans in high latitudes. *Ekologiya cheloveka*. 2012; 1: 3-11. (in Russian)
7. Demin D. B., Poskotinova L. V., Krivonogova E. V. Age Features of Cardiovascular System Functional Parameters in Adolescents Living in Different Arctic Areas. *Ekologiya cheloveka*. 2015; 7: 27-32. (in Russian)
8. Yur'ev Yu.Yu., Tipisova E.V. Age aspects of endocrine status in men permanent and newly arrived residents of city of Arkhangelsk. *Ekologiya cheloveka*. 2009; 7: 15-9. (in Russian)
9. Tkachev A.V., Boyko E.R., Gubkina Z.D., Ramenskaya E.B., Sukhanov S.G. Endocrine system and metabolism in humans in the North. [Endokrinnaya sistema i obmen veshchestv u cheloveka na Severe]. Syktyvkar: KNC Ural'skogo otdeleniya Rossiyskoy akademii nauk; 1992. (in Russian)
10. Krasovitskiy R.A., Tetelyutin A.O., Gasnikov K.V., Bushmeleva N.N., Davtyan K.A. Medico-social aspects of the preservation of somatic and reproductive health in women of the Finno-Ugric group. *Meditsinskij al'manakh*. 2011; 3(16): 31-4. (in Russian)
11. Gubkina Z.D. Trends of changes in the norms of physical and sexual development in the female population of the polar regions of the Arkhangelsk region. In: Solonin YU.G., ed. Physiological regularities of hormonal, metabolic, immunological changes in the human body in the European North. Syktyvkar: Trudy Komi nauchnogo tsentra Ural'skogo otdeleniya RAN; 1997: 44-70. (in Russian)
12. Zaharova T.G., Kashina M.A., Zaharov G.N. Depending of the Far North indigenous women reproductive health on the lifestyle. *Zemskiy vrach*. 2012; 3: 47-50. (in Russian)
13. Darenkaya M.A. Peculiarities of metabolic reactions in indigenous and migrant populations of the North and Siberia. *Bulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2014; 2(96): 97-103. (in Russian)
14. Tipisova E.V., Kipriyanova K.E., Elfimova A.E., Gorenko I.N. Changes in serum hormone levels in the middle and gerontic aged inhabitants of Arkhangelsk due to the gender identity. *Uspekhi gerontologii*. 2015; 28(4): 713-7. (in Russian)
15. Cirkin V.I., Bagaev V.I., Bejn B.N. Role of dopamine in brain activity (literature review). *Vyatskiy meditsinskiy vestnik*. 2010; 1: 7-18. (in Russian)
16. Valeeva L.A., Harchilava O.M. The role of dopamine receptors in the pathogenesis of the menopause syndrome and in mechanisms of female hormone effects. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2007; 2(6): 34-8. (in Russian)
17. Leonova Z.A., Florensov V.V. Synthesis and functions of female sex hormones. *Sibirskiy meditsinskij zhurnal*. 2013; 2: 10-3. (in Russian)
18. Volzhanina E.A. The influence of ethnically mixed families on the number of Nenets living in the territory of the Yamal-Nenets autonomous region, at the end of the XXth century, the beginning of the XXIst century. *Vestnik arkheologii, antropologii i etnografii*. 2008; 8: 127-39. (in Russian)
19. Volzhanina E.A. Number, resettlement and traditional farming of Vyngapur Nenets in conditions of commercial development. *Vestnik arkheologii, antropologii i etnografii*. 2010; 1(12): 174-83. (in Russian)
20. Tipisova E.V., Kipriyanova K.E., Gorenko I.N., Lobanov A.A., Popov A.I. et al. The content of dopamine and hormones of system "hypophysis-thyroid" in blood of nomadic, settled and local population of the Arctic. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(5): 291-6. (in Russian)
21. Liu X., Herbison A.E. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. *Endocrinology*. 2013; 154(1): 340-50.
22. Tipisova E.V., Gorenko I.N., Popkova V.A., Popov A.I., Andronov S.V. The correlation of dopamine, sex hormones, antisperm antibodies, sex hormone binding globulin, cAMP in aboriginal and local male population of the Arctic zone of the RF. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2018; 15(2): 218-28. (in Russian)

REFERENCES:

1. Bobyleva I.V. The nature of metabolic and endocrine disorders in women with natural and surgical menopause. *Bulleten' meditsinskikh Internet-konferentsiy*. 2015; 5(4): 219-21. (in Russian)
2. Esedova A.E., Hashaeva T.H.-M., Abusueva Z.A., Gamzaev A.K., Idrisova M.A., Mahtibekova P.A. Markers of bone remodeling and calcium-phosphorus metabolism in women with osteopenia on the background of non-insulin-dependent diabetes mellitus in postmenopausal women. *Vestnik Dagestanskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii*. 2015; 2(15): 30-4. (in Russian)
3. Nikolenko L.A., Alyohin D.I., Nikolenko E.S. Postmenopause, metabolic syndrome and IHD (literature review). *Problemy reproduktiv. 2015; 21(3): 117-21. (in Russian)*
4. P'ina L.M., Yureneva S.V., Dubrovina A.V., Jebzieva Z.H. The influence of menopause on life of working women: the problem without necessary attention. *Problemy reproduktiv. 2016; 22(1): 87-94. (in Russian)*
5. Gromova G.G., Burmasova A.V. Adaptation of the human body to the conditions of the Far North. II All-Russian Scientific and Practical Conference «The North of Russia: Strategies and Development Prospects». [II Vserossiyskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya «Sever Rossii: strategii i perspektivy razvitiya»]. Surgut; 2016: 89-98. (in Russian)

ЦИТОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616-08-039.74-076.5

Круглова И.А.¹, Денисенко А.Н.¹, Зиновьев С.В.², Уткин О.В.^{2,3}, Князев Д.И.³

ВОЗМОЖНОСТИ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ХАРАКТЕРА ЭКССУДАТА НА ЭТАПЕ ОКАЗАНИЯ ЭКСТРЕННОЙ ПОМОЩИ

¹ГБУЗ «Городская больница №35», 603089, Нижний Новгород, Россия;

²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603950, Нижний Новгород, Россия;

³ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора», 603005, 603006, Нижний Новгород, Россия

Цитологическая диагностика по выпотным жидкостям в настоящее время - единственный достоверный метод морфологической верификации диагноза, имеет прогностическую значимость и определяет выбор стратегии лечения. Вместе с тем вариабельность нормальных клеток мезотелия вызывает значительные затруднения в его дифференциальной диагностике с реактивно изменённым мезотелием, злокачественной мезотелиомой и метастазом рака, что требует привлечения дополнительных аналитических методов. Проведено ретроспективное исследование цитологических препаратов за 2017 г., а также оценена эффективность применения флуоресцентной иммуноцитохимии (ФИЦХ) на тест-системе «Биочип» в сочетании с традиционным цитологическим исследованием. За период ноябрь 2017г. – июль 2018г. исследовано 46 экссудатов серозных полостей: у 9(19,6%) пациентов диагностировали метастатический выпот, у 31 (66,7%) пациента установлен реактивный характер экссудата, высказано подозрение на злокачественную природу серозной жидкости у 4(8,7%) пациентов, а у 4,8% (2 образца) точный диагноз поставить не удалось. После проведения дополнительного исследования ФИЦХ с использованием тест-системы «Биочип» число пациентов с установленным диагнозом метастатический выпот возросло до 7 (25,9%) за счёт снижения процента случаев неустановленного характера выпота. Совместное использование методов традиционной цитологии и ФИЦХ в диагностике выпотных жидкостей на этапе оказания экстренной медицинской помощи пациенту способствует более быстрой и достоверной постановке диагноза, так как позволяет подтвердить злокачественность исследуемого материала и предположить местонахождение первичного очага.

Ключевые слова: цитологическая диагностика по выпотным жидкостям; иммуноцитохимия; ФИЦХ; биочип; флуоресценция; цитологическое исследование экссудата.

Для цитирования: Круглова И.А., Денисенко А.Н., Зиновьев С.В., Уткин О.В., Князев Д.И. Возможности цитологической диагностики экссудата на этапе оказания экстренной помощи. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (12): 768-772. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-768-772>

Kruglova I. A.¹, Denisenko A. N.¹, Zinoviev S. V.², Utkin O. V.^{2,3}, Knyazev D. I.³

POSSIBILITIES OF CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF THE NATURE OF THE EXUDATE AT THE STAGE OF EMERGENCY

¹ State budgetary institution of health care "City hospital No. 35", 603089, Nizhny Novgorod;

² Federal state budgetary educational institution of higher professional education "Privolzhskiy Research Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federatsii, 603950, Nizhny Novgorod;

³ Federal budgetary institution of science "Nizhny Novgorod research Institute of epidemiology and microbiology. academician I. N. Blokhina Rospotrebnadzor", 603005, 603006, Nizhny Novgorod, Russia

Cytological diagnosis by effusions is currently the only reliable method of morphological verification of the diagnosis, it has prognostic significance and determines the choice of treatment strategy. At the same time, the variability of normal mesothelial cells causes significant difficulties in its differential diagnosis with reactive mesothelium, malignant mesothelioma and cancer metastasis, which requires additional analytical methods. A retrospective study of cytological preparations for 2017 was conducted, as well as the effectiveness of the use of fluorescent immunocytochemistry (FITZ) on the test system "biochip" in combination with a traditional cytological study was evaluated. During the period of November 2017 – July 2018, 46 exudates of serous cavities were studied, which showed that 9 patients (19.6%) were diagnosed with metastatic effusion, 31 (66.7%) patients had reactive exudate, suspicion of the malignant nature of serous fluid was expressed in 4 patients (8.7%), and 4.8% of persons (2 samples) failed to make an accurate diagnosis. After an additional FITZ study using the "Biochip" test system, the number of patients diagnosed with metastatic effusion increased to 7 (25.9%) due to a decrease in the percentage of cases of unspecified effusion. The combined use of traditional cytology and fluorescent immunocytochemistry in the diagnosis of effusion fluids at the stage of emergency medical care to the patient complements each other and contributes to a faster and more reliable diagnosis, as it allows to confirm the malignancy of the test material, and to assume the primary focus.

Key words: cytological diagnosis of exudative liquids; immunocytochemistry; FISH; biochip; fluorescence; cytology of exudates.

For citation: Kruglova I. A., Denisenko A. N., Zinoviev S. V., Utkin O. V., Knyazev D. I., Possibilities of cytological diagnosis of the nature of the exudate at the stage of emergency, *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (12): 768-772 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-768-772>

For correspondence: Kruglova I.A., clinical laboratory diagnostics doctor (cytologist); e-mail: irisha-kruglova@yandex.ru

Information about authors:

Kruglov I. A. <https://orcid.org/0000-0001-7955-349X>

Denisenko A. N. https://elibrary.ru/autor_items.asp?authorid=16069

Zinoviev, S. V. <https://orcid.org/0000-0003-1037-2601>

Utkin O. V. <https://orcid.org/0000-0002-0941-9890>

Knyazev D. I. <https://orcid.org/0000-0003-4797-2520>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 06.12.2018
Accepted 10.12.2018

Введение. Брюшная, плевральная и перикардиальная полости (серозные полости) человека со стороны целома выстланы однослойным мезотелием. В норме мезотелий характеризуется полиморфизмом, приобретающим признаки выраженной пролиферации при неоплазиях, инфекционных заболеваниях и других патологических состояниях [4, 11].

У здорового человека в каждой из серозных полостей находится небольшое количество жидкости: перикардиальная - до 2,0 мл, плевральная - около 10,0 мл, брюшная - до 50,0 мл. Считается, что объём жидкости в серозных полостях организма в количестве, достаточном для пункции, говорит о наличии патологического процесса [4, 15]. Следует отметить, что цитологическая диагностика по выпотным жидкостям на данный момент времени остаётся единственным достоверным методом (от 64 до 96%) морфологической верификации диагноза, имеет прогностическую значимость и определяет выбор стратегии лечения [1, 2, 5]. Вместе с тем вариабельность нормальных клеток мезотелия вызывает затруднения при дифференциальной диагностике с реактивно изменённым мезотелием, злокачественной мезотелиомой и метастазом рака, что требует привлечения дополнительных аналитических методов [4, 15].

К признакам злокачественной трансформации мезотелиальных клеток относят высокую клеточность препарата, большой размер и изменение формы клеток, присутствие папиллярных, многоядерных структур, многоядерные клетки с признаками гипертрофии ядер и нуклеол. Для клеток пролиферирующего мезотелия и злокачественной мезотелиомы общими признаками являются наличие зубчатых границ пластов, краевое снижение интенсивности окраски цитоплазмы, низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение [16]. Злокачественную мезотелиому чётко характеризуют клетки «одной популяции», сходные между собой. Метастатический характер выпотной жидкости характеризуют контуры клеточных комплексов, формирующих многослойные и железистоподобные структуры, резко выраженная разница в размерах клеток (от 10–15 мкм до 100–200 мкм), ядерный полиморфизм и др. [6, 7]. Несмотря на это единых цитологических критериев, позволяющих дифференцировать мезотелиому и метастатический рак, не разработано [16]. В этой связи цитологическая диагностика по выпотным жидкостям осуществляется во взаимосвязи с клинической картиной заболевания. По данным литературы у 14% больных с экссудатом в плевральной полости и у 7% пациентов с асцитом первичный диагноз злокачественной опухоли устанавливается

по результатам исследования серозной жидкости при обращении в ЛПУ по причине другого заболевания. У 15% таких пациентов на момент исследования первичная локализация опухоли неизвестна, а в 3-7% случаев необходима дифференциальная диагностика между прогрессированием основного заболевания и первично-множественным поражением [6, 14].

Стандартные диагностические алгоритмы клинико-рентгенологических и лабораторных исследований позволяют установить природу экссудата лишь в 80–85% случаев (Лискина И.В., Суслов Е.И., Куц В.В., 2007). Описанную ранее проблему в большинстве случаев можно преодолеть, используя иммуноцитохимические исследования (ИЦХИ).

По данным литературы метастатический аденогенный рак характеризуется положительной реакцией (до 90% случаев) на ЕрСАМ (клон ВегЕр4), который экспрессируется на мембране эпителиальных клеток, в том числе злокачественно трансформированных [11, 16]. В сочетании с другими маркерами ЕрСАМ может использоваться в выявлении опухолей эпителиального происхождения и в дифференциальной диагностике между аденокарциномой и мезотелиомой. Позитивную реакцию на ЕрСАМ выявляют в 100% аденогенных карцином лёгкого, в 93% нелёгочных карцином, в 100% при плоскоклеточном раке, в 84% при аденокарциноме без первично выявленного очага, в 26% при мезотелиоме [1, 2, 15]. Кроме того, клетки злокачественной мезотелиомы дают положительную реакцию на кальретинин, мезотелин, тромбодулин, а также виментин и панцитокератины [13].

Используя данные ИЦХИ выпотных жидкостей, с высокой долей вероятности можно определить локализацию патологического процесса. Например, при раке яичника выявляется положительная реакция к СК7, СА125 и РЭА на фоне отрицательной реакции к СК20 и вариабельности картины экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона [5]. Другим примером высокой диагностической значимости исследования выпотных жидкостей методом ИЦХИ является возможность дифференцировки аденогенного и мелкоклеточного рака лёгкого (МКРЛ). Аденогенный вариант РЛ даёт положительную реакцию на СК7 и TTF-1. МКРЛ дополнительно характеризуется положительной реакцией на хромогранин А, синаптофизин, CD57 [5].

ИЦХИ традиционных цитологических препаратов является финансово- и времязатратной процедурой, что обусловлено значительным расходом антител и продолжительностью подготовительного этапа. Для оптимиза-

ции диагностики и снижения стоимости исследования в настоящее время применяют биочипы, позволяющие проводить мультиплексный анализ опухолевых маркеров. Исследуя с их помощью серозные жидкости, обладающие низким по сравнению с кровью клеточным составом, можно определить характер выпота (реактивный или неопластический), а также обнаружить первичный опухолевый очаг.

Цель исследования – повысить качество цитологической диагностики по выпотным жидкостям за счёт использования флуоресцентного ИЦХИ на тест-системе «Биочип», а также установить преимущества тест-системы «Биочип» перед традиционным ИЦХИ.

Материал и методы. Материалом служил серозный экссудат неясной этиологии, полученный от 27 пациентов, поступивших в приёмное отделение городской больницы № 35 Нижнего Новгорода. Полученный биоматериал исследовали методом традиционной цитологии, суть которого заключается в сухой фиксации биообразца на стекле с последующей окраской по Романовскому и светооптической микроскопией препарата, а также с помощью разработанных нами биочипов (патент на полезную модель № 142470). Последние представляют собой стеклянную подложку, рабочая зона которой имеет адгезивное покрытие, разделённое пластиковой решёткой на 15 секторов, каждый из которых содержит определённое наименование AlexaFluor488-конъюгированных моноклональных антител, направленных к антигенам опухоли (рис.1).

Процесс исследования материала с использованием биочипов включает несколько этапов.

Получение клеточного осадка путём центрифугирования образца в течение 5 мин при 2000 об/мин с последующей двукратной отмывкой избытком 6% раствора полиглокина.

Внесение клеточного материала в ячейки рабочей зоны биочипа с последующей инкубацией в течение 30 мин в термостате при 37°C.

Флуоресцентная микроскопия биочипа.

Для визуализации результатов, полученных методом традиционной цитологии и с помощью биочипов, применяли микроскопы Zeiss Primo Star (Carl Zeiss, Германия) и Leica DM1000 (Leica, Германия).

Также проведено ретроспективное исследование цитологических препаратов выпотных жидкостей за 2016 г.

Результаты и обсуждение. При ретроспективном исследовании получены следующие результаты: всего было 97 пациентов с наличием свободной жидкости в брюшной и/или плевральной полости, при этом цитологическое исследование проведено у 23 (23,7%) пациентов. По результатам исследования реактивные клеточные изменения установлены у 19 (82,6%) пациентов, подозрительные клеточные изменения – у 3 (13%) и злокачественные изменения – у 1 (4,3%) пациента. Данные показатели объясняются отсутствием специалистов и недостаточной подготовкой сотрудников для выполнения цитологических исследований в лаборатории.

С внедрением цитологического метода за период ноябрь 2017 г. – июль 2018 г. исследовано 46 экссудатов серозных полостей. У 9 (19,6%) пациентов диагностировали метастатический выпот, у 31 (66,7%) – реактивный характер экссудата; подозрение на злокачественную природу серозной жидкости было у 4 (8,7%) пациентов, а у 4,8% лиц (2 образца) точный диагноз поставить не удалось.



Рис.1. Структурные элементы биочипа.

1 – рабочая зона, разделённая на 15 ячеек, в каждой из которых содержится определённое антитело; 2 – функциональная зона, содержащая информацию об антителах и их локализации (в ячейке 1 – антитело к СА-125, в ячейке 2 – антитело к РЭА, в ячейке 3 – антитело к СК7 и т.д.).

После проведения дополнительного флуоресцентного ИЦХИ (ФИЦХИ) с использованием тест-системы «Биочип» число пациентов с установленным диагнозом - метастатический выпот - возросло до 7 (25,9%) за счёт снижения процента случаев неустановленного характера выпота. Наиболее информативные клинические случаи описаны далее.

Клинический случай № 1. Пациентка 70 лет поступила в приёмное отделение с диагнозом острая кишечная непроходимость; асцит. При рентгенографии брюшной полости на фоне свободного газа определяется уровень свободной жидкости в центральной части брюшной полости, раздутые петли тонкой кишки и восходящей части ободочной кишки. Выполнен лапароцентез с забором 600 мл асцитической жидкости.

На светооптическом уровне отмечаются обильные скопления клеток среднего размера с периферически расположенным и увеличенным ядром (ядерно-цитоплазматическое соотношение повышено), неровной ядерной мембраной; хроматин в клетках распределён неравномерно (складчатость, мелкие борозды), в большинстве ядер детектируется одно или несколько ядрышек, форма клеток овальная, цитоплазма серо-голубая с мелкой вакуолизацией. Расположение клеток в препаратах как раздельное, так и в виде папилляроподобных скоплений. В небольшом количестве в препаратах встречаются мелкие клетки с серо-голубой цитоплазмой и центрально расположенным ядром. Ядерно-цитоплазматическое соотношение не нарушено, контур ядерной мембраны ровный, хроматин мелкозернистый, распределён равномерно. Клетки располагаются раздельно или в виде мелких скоплений из 4–5 клеток (рис.2, а–г, см. обложку). Дано заключение о предположительно злокачественной природе полученной жидкости (вторичный характер поражения). При проведении ФИЦХИ на биочипах отмечали положительные реакции на СК7, рецепторы эстрогена, СА-125, HerEr4, РЭА и отрицательные реакции с СК20, TTF-1, виментином, CDX2 (рис.2, д–к, см. обложку). Полученный иммунофенотип соответствует метастатической природе экссудата (вероятно, аденокарцинома яичника). По результатам проведённой операции и гистологического исследования выявлена аденокарцинома умеренной степени дифференцировки с иммунофенотипом при постановке иммуногистохимического исследования (ИГХИ) СК7+, СК20-, рецепторы к эстрогенам+, CDX2-, СА125+, что соответствует аде-

нокарциноме яичника. При сопоставлении результатов, полученных при ФИЦХИ на биочипах и ИГХИ, совпадение отмечено по всем антителам.

Клинический случай № 2. Пациент 63 лет, направленный в приёмное отделение с диагнозом левосторонний экссудативный плеврит для удаления накопившейся жидкости. По данным рентгенографии грудной клетки в левой плевральной полости уровень жидкости до VII ребра. После плевральной пункции получено 1100 мл геморрагической жидкости.

На светооптическом уровне фон препаратов представлен клетками лимфоцитарного ряда, гистиоцитами и мономорфными клетками малого размера, округлой формы с обильной серо-голубой цитоплазмой и эксцентрически расположенным ядром. Клетки локализованы раздельно или в виде мелких пластов (по 5–7 клеток). Ядерная мембрана ровная, хроматин распределён равномерно (рис.3, а, б, см.обложку). В пластах встречаются крупные клетки округлой формы с серо-голубой цитоплазмой, в части которых отмечаются признаки вакуолизации, а ядерно-цитоплазматическое соотношение смещено в сторону ядра. Контур ядерной мембраны неровный, хроматин распределён неравномерно, практически в каждом ядре выявляли одно или несколько ядрышек с признаками гипертрофии (рис.3, в–ж). На основе традиционной цитологии дано заключение о метастатическом характере полученной жидкости (предположительно аденокарцинома лёгкого). При проведении ФИЦХИ на биочипах отмечены положительные реакции на СК7, ТТФ-1, ВегЕр4, РЭА и отрицательные реакции с СК20, виментином, CDX2, СА-125, рецепторами эстрогена (рис.3, з–л). Иммунофенотип соответствует метастатическому процессу (аденокарцинома лёгкого). При гистологическом исследовании в плевре обнаружены метастазы аденокарциномы. Иммунофенотип при ИГХИ (CD56-, ТТФ1+, р63-, СК7+) соответствует аденокарциноме лёгкого. Совпадение экспрессии при ФИЦХИ на биочипах и ИГХИ отмечено по основным антителам (при ФИЦХИ использована более расширенная панель антител).

Клинический случай №3. Пациент в возрасте 37 лет поступил в приёмное отделение с диагнозом экссудативный правосторонний плеврит; внебольничная пневмония?, сопутствующая патология ВИЧ-инфекция стадии 2В. В клинической картине субфебрильная температура в течение 2 нед, нарастающая одышка, боли в грудной клетке справа. При рентгенографии грудной клетки в правой половине усиление лёгочного рисунка, горизонтальный уровень жидкости до VI ребра, на фоне которого фрагмент затемнения в области S6. После плевральной пункции удалено 1250 мл мутной жидкости жёлтого цвета.

На светооптическом уровне в цитологических препаратах наблюдали разрозненные клетки, а также псевдопапиллярные скопления с относительно чётким контуром и нерезким наложением внутренней архитектоники. Размер клеток варьировал в широких пределах, форма клеток округло-овальная, а ядерно-цитоплазматическое соотношение низкое, встречали двух- и многоядерные клетки (ядра расположены эксцентрически, хроматин грубый, просматривались ядрышки, фигуры митоза), цитоплазма от светло-голубой до базофильной, выявляя цитоплазматические выросты и вакуоли (рис.4, а–г, см.обложку). Основываясь только на результатах традиционной цитологии и данных анамнеза, трудно

дифференцировать морфотип между злокачественным поражением и реактивными изменениями. При проведении ФИЦХИ на биочипах отмечены отрицательные реакции с СК20, виментином, CDX2, СА-125, рецепторами эстрогена, СК7, ТТФ-1, ВегЕр4, РЭА, подопланином, что соответствует реактивной природе экссудата (рис. 4, д–е, см.обложку). По данным дополнительных методов инструментального обследования подозрительных очагов у пациента выявлено не было, в связи с чем ИГХИ в данном случае не проводилось.

Анализ применения тест-системы «Биочип» выявил следующие особенности:

Совпадение преаналитического этапа подготовки материала для традиционной цитологии, ФИЦХИ с использованием тест-системы «Биочип» и традиционного ИЦХИ.

Формирование специфических иммунных комплексов с антителами в тест-системе «Биочип» и традиционной ИЦХИ занимает одинаковое время (30 мин).

Визуализация результата в тест-системе «Биочип» не требует дополнительных манипуляций и возможна сразу после окончания реакции, что снижает время исследования по сравнению с традиционной ИЦХИ в 2–3 раза (в зависимости от используемой системы визуализации), которое составило около 60 мин.

Возможность исследования до 15 антител на одной тест-системе повышает информативность полученных результатов и не требует подготовки дополнительных образцов в сравнении с традиционным ИЦХИ.

Последующее изучение клеточного состава в ячейках тест-системы «Биочип» после оценки реакций иммунофлуоресценции и окрашивания традиционным способом показало сохранение всех морфологических показателей клеточных изменений, учитывающихся при постановке диагноза в традиционной цитологии.

Заключение. Цитологический метод в качестве диагностического исследования выпотных жидкостей является целесообразным и клинически значимым.

Реализация ИЦХИ с использованием тест-системы «Биочип» занимает меньше времени по сравнению с традиционным ИЦХИ. Таким образом, данный метод с полным основанием можно отнести к категории экспресс-диагностики. Совместное использование методов традиционной цитологии и флуоресцентной иммуноцитохимии в диагностике выпотных жидкостей на этапе оказания экстренной медицинской помощи пациенту способствует более быстрой и достоверной постановке диагноза, так как в современной экологической обстановке и в процессе метастазирования опухолевые клетки могут утрачивать свой иммуноцитохимический профиль, присущий органу. Использование иммуноцитохимической диагностики позволяет не только подтвердить злокачественность исследуемого материала, но и установить первичный очаг.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 12-17 см. REFERENCES)

1. Волченко Н.Н., Борисова О.В., Шевчук А.С. Цитологическая диагностика пограничных опухолей яичника. *Онкология*. 2013; 4: 25-9.
2. Волченко Н.Н., Борисова О.В. Современные возможности цитологического метода при исследовании плевральных и перитонеальных жидкостей.

ЦИТОЛОГИЯ

- неальных экссудатов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 5: 23–7.
3. Волченко Н.Н., Савостикова М.В. Атлас цитологической и иммуноцитохимической диагностики опухоли. М.: Репроцентр М; 2010.
 4. Долгов В.В., Шабалова И.П., Миронова И.И. и др. Выпотные жидкости. Тверь: Триада; 2006.
 5. Глузман Д.Ф. Диагностическая иммуноцитохимия опухолей. Киев: Морин; 2003.
 6. Григорук О.Г., Базулина Л.М., Лазарев А.Ф. Использование иммуноцитохимических методов исследований при изучении экссудатов из серозных полостей в практической работе лабораторий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 1: 20–12.
 7. Григорук О.Г., Дорошенко Л.М., Лазарев А.Ф. Злокачественная мезотелиома плевры: возможности использования иммуноцитохимических методик. *Сибирский онкологический журнал*. 2008; 1: 51–4.
 8. Клюкина Л.Б., Ерохина О.А., Гапанович Е.А. и др. Цитологический метод исследования выпотных жидкостей. *Онкологический журнал*. 2012; 6 (1): 79–85.
 9. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань: Идеал-Пресс; 2004.
 10. Савостикова М.В., Фурминская Е.Ю., Федосеева Е.С., Кудайбергенова А.Г. Флуоресцентное иммуноцитохимическое исследование выпотов и смывов с серозных полостей при интраоперационной диагностике. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(12): 742–5.
 11. Семенов Д.А., Целуйко С.С. Гистофизиология плевральной полости и плеврального выпота. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2012; 2 :140–4.
 12. Долгов В. В., Шабалова И. П., Миронова И. И. et al. Effluent liquids. Tver': Triada; 2006. (in Russian)
 13. Gluzman D.F. Diagnostic immunocytochemistry of tumors. Kiev: Morion; 2003.
 14. Grigoruk O. G., Bazulin L. M., Lazarev A. F. The use of immunocytochemical methods in the study of exudate of serous cavities in the practical work of laboratories. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 1: 51–4. (in Russian)
 15. Grigoruk O. G., Doroshenko M., L., Lazarev, A. F., Malignant mesothelioma of the pleura: the possibilities of using immunocytochemical methods. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal*. 2008; 1: 51–4. (in Russian)
 16. Klukin L. B., Erokhin, O. A., Gapanovich E. A. et al. Cytological method of investigation of exudative fluids. *Onkologicheskij zhurnal*. 2012; 6 (1): 79–85. (in Russian)
 17. Petrov S. V., Raikhlin N. T. Manual immunohistochemical diagnosis of human tumors [Rukovodstvo po immunogistohimicheskoy diagnostike opukholey cheloveka]. Kazan': Ideal-Press; 2004. (in Russian)
 18. Savostikova M. V., Furminskaya E. Y., Fedoseeva E. S., Kudaibergenova A. G. Fluorescent immunocytochemical study of effusions and washes of serous cavities in intraoperative diagnosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62 (12): 742–5.
 19. Semenov D., Tseluyko S. S. Histophysiology of pleural cavity and pleural effusion. *Dal'nevostochnyi meditsinskiy zhurnal*. 2012; 2: 140–4. (in Russian)
 20. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry. Edinburgh; Elsevier Science, 2006.
 21. Gabris S., Kern L. Two color immunostaining of pleural effusions with Ber-EP4 and CK5/6. *Cytopathology*. 2004; 15 (Suppl.2):14.
 22. Koss L.G., Woyke S., Oeszewski W. Aspiration biopsy: cytologic interpretation and histologic bases 2nd ed. New York – Tokyo, Igaku-Shoin, Medical Publishers, Inc.; 1992.
 23. Pereira T.C. The diagnosis of malignancy in effusion cytology: a pattern recognition approach. *Advances in Anatomic Pathology*. 2006;13(4): 174–84.
 24. Schnell U., Cirulli V., Giepmans B.N. EpCAM: structure and function in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1828:1989–2001.

Поступила 06.12.18

Принята к печати 10.12.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.314.17-002-076.5

Базарный В.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н., Мандра Ю.В.

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОМ ПАРОДОНТИТЕ

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 620028, Екатеринбург, Россия

Данное исследование посвящено изучению особенностей буккального эпителия при хроническом генерализованном пародонтите (ХГП). Обследовано 102 пациента, у которых оценивали буккальную цитограмму. В результате проведенного исследования установили, что клетки в состоянии апоптоза являются достаточно чувствительным маркером начальной стадии (лёгкой степени) пародонтита. Число буккальных эпителиоцитов с данными особенностями возросло в 2,1, 3,0, 13,4 раза при ХГП лёгкой, средней и тяжёлой степени соответственно. Полученные данные свидетельствуют о накоплении цитологических аномалий (микроядра, протрузии ядра и другие) у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом.

Ключевые слова: буккальный эпителий; пародонтит.

Для цитирования: Базарный В.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н., Мандра Ю.В. Цитологическая характеристика буккального эпителия при хроническом генерализованном пародонтите. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (12): 773-776. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-773-776>

Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Maksimova A.Y., Svetlakova E.N., Mandra Yu.V.

CYTOLOGICAL CHARACTERISTIC OF THE BUCCAL CELLS IN CHRONIC GENERALIZED PERIODONTITIS
FSBEI HE «Ural State Medical University»; 620028, Yekaterinburg, Russia

The research is devoted to the study of the occurrence of abnormal cells in buccal epithelium in patients with chronic generalize periodontitis. Buccal cytograms of 102 patients were examined. It was established that cells with karyopycnosis, karyorexis and karyolysis are a sensitive index of the initial stage (mild severity) in periodontitis. The number of buccal cells with these features was increased in 2.1; 3.0; 13.4 times for chronic generalized periodontitis of mild, moderate and severe degree, respectively. The obtained data shown the accumulation of cytological anomalies (micronucleus, protrusion of the nucleus and other) in patients with chronic generalized periodontitis.

Key words: buccal cells; periodontitis.

For citation: Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Maksimova A.Y., Svetlakova E.N., Mandra Yu.V. Cytological characteristic of the buccal cells in chronic generalized periodontite. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (12): 773-776 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-773-776>

For correspondence: Bazarnyi V.V., MD, professor, senior researcher of the general pathology department; e-mail-vlad-bazarny@yandex.ru

Information about authors:

Bazarnyi V. V. <https://orcid.org/0000-0003-0966-9571>
Polushina L. G. <https://orcid.org/0000-0002-4921-7222>
Maksimova A. Yu. <https://orcid.org/0000-0001-8412-4315>
Svetlakova E.N. <https://orcid.org/0000-0002-7592-8343>
Mandra Yu.V. <https://orcid.org/0000-0002-8439-3272>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 03.09.2018

Accepted 21.11.2018

Цитологическое исследование буккального эпителия (БЭ) до последнего времени было ограничено так называемым «микроядерным тестом», который считается одним из показателей генотоксического воздействия факторов внешней среды и нестабильности генома при канцерогенезе [1–4]. В настоящее время данный тест сохраняет свою актуальность при проведении биомониторинга, о чём свидетельствует возрастающее число публикаций [5–9]. Однако постепенно накапливались данные о реактивных изменениях буккальной цитограм-

мы при таких заболеваниях, как сахарный диабет 2-го типа, талассемия и др. [10–13]. В то же время клиническая значимость клеточных изменений не была установлена. Это определило цель исследования – установить диагностическую эффективность цитологических аномалий БЭ при хроническом генерализованном пародонтите (ХГП).

Материал и методы. Работа основана на результатах клинко-лабораторного обследования 102 человек в возрасте от 24 до 67 лет. Контрольная группа представлена 38 практически здоровыми добровольцами, основная группа – 64 пациентами (36 – пародонтит лёгкой степени, 13 – пародонтит средней степени, 15 – тяжёлой степени). Диагноз ХГП был установлен на основании стандартных клинко-рентгенологических критериев,

Для корреспонденции: Базарный Владимир Викторович, д-р мед. наук, проф., гл. науч. сотр. отдела общей патологии; e-mail: vlad-bazarny@yandex.ru

ЦИТОЛОГИЯ

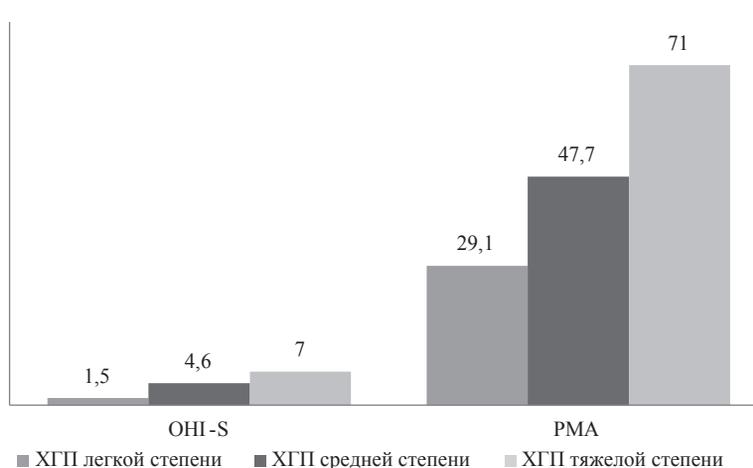
принятых «Стоматологической ассоциацией России» (2013). Кроме того, дополнительно определяли упрощённый индекс гигиены – ОНИ-S и папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс – РМА.

Для цитологического исследования материал собирали с внутренней поверхности щеки с помощью цитощётки и переносили на предметное стекло, равномерно распределяя биоматериал. Фиксация препаратов осуществлялась красителем-фиксатором эозин метиленовый синий типа Лейшмана в течение 2 мин с последующей окраской раствором азура-эозина по Романовскому в течение 20 мин. При подсчёте 1000 клеток определяли соотношение базальных, промежуточных и поверхностных клеток. Кроме того, оценивались следующие цитологические аномалии: клетки с микроядрами, двуядерные клетки, клетки с протрузиями, клетки в состоянии апоптоза и перинуклеарной вакуолю, результат выражали в процентах. Статистический анализ данных проводился с использованием средств пакета Microsoft Excel и программой анализа данных Gretel. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического статистического критерия Манна-Уитни. Диагностические характеристики определяли с помощью ROC-анализа (программа MedCalc).

Результаты. Анализ стоматологического статуса пациентов выявил существенные изменения стандартных индексов, используемых в пародонтологии – ОНИ-S и РМА, что подтверждает адекватность распределения пациентов по группам и отражает тяжесть процесса (см. рисунок).

В буккальных цитограммах у большинства пациентов отсутствовали базальные клетки, отмечено снижение уровня промежуточных и повышение числа поверхностных по мере нарастания тяжести ХГП (табл. 1).

Содержание клеток с аномалиями, указывающими на цитологические особенности (клетки с микроядрами



Клиническая характеристика пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом.

ОНИ-S - упрощенный индекс гигиены; РМА - папиллярно-маргинально альвеолярный индекс.

и ядерными протрузиями), также возрастало по мере прогрессирования заболевания; так, количество последних было в 2,4 раза выше, чем в контрольной группе. Но более выраженным было возрастание числа клеток с микроядрами, в частности при тяжелой степени пародонтита, – в 4 раза ($p < 0,01$).

Кариолизис, кариопикноз и кариорексис – последовательные стадии деградации клеточного ядра, в результате чего формируются апоптические тельца. Число буккальных эпителиоцитов с данными особенностями возрастало в 2,1; 3,0; 13,4 раза при ХГП легкой, средней и тяжелой степени соответственно (табл. 1).

Полученные данные свидетельствуют о накоплении цитологических аномалий (микроядра, протрузии ядра) у пациентов с ХГП, повышении активности апоптоза и дегенеративно-дистрофических процессов, характерных для хронического воспаления.

Для объективной оценки диагностической ценности установленных сдвигов использовался ROC-анализ,

Таблица 1

Цитограмма буккального эпителия при хроническом генерализованном пародонтите

Показатели	Контрольная группа Me (Q)	ХГП лёгкой степени Me (Q), %	ХГП средней степени Me (Q), %	ХГП тяжёлой степени Me (Q), %
Промежуточные клетки, %	57,6 (46,4; 89,0)	60,7 (51,5; 70,6)	61,2 (54,6; 70,4)	53,6 (47,9; 62,9)
<i>p</i>		0,07	0,06	0,08
Поверхностные клетки, %	32,0 (3,7; 44,9)	11,6 (6,8; 25,8)	7,4 (6,6; 13,4)	14,6 (7,0; 25,5)
<i>p</i>		0,07	0,03	0,06
Клетки с микроядрами, %	0,1 (0; 0,6)	1,6(0; 3,0)	3,4 (0; 4,0)	4,4 (0; 5,0)
<i>p</i>		0,13	0,006	0,003
Клетки с протрузиями, %	0(0; 0,4)	1,2(0;2,2)	2,4 (0; 3,1)	2,4 (0; 4,2)
<i>p</i>		0,09	0,006	0,01
Двуядерные клетки, %	1,2 (0,2; 2,2)	1,3(0,8; 1,6)	1,6 (1,4; 2,0)	1,4 (1,1; 1,7)
<i>p</i>		0,06	0,12	0,08
Клетки в состоянии апоптоза, %	0,9(0,4; 1,4)	2,3 (0,8; 4,3)	4,3 (1,1;3,8)	12,0 (1,4; 8,7)
<i>p</i>		0,005	0,006	0,003

Примечание. *p* – в сравнении с контрольной группой.

Таблица 2

**Диагностическая эффективность цитологических аномалий
буккального эпителия при хроническом генерализованном
пародонтите**

Показатель	ДЧ, %	ДС, %	AUC
Клетки с микроядрами	64	74	0,67
Клетки с протрузиями	54	95	0,68
Двухядерные клетки	68	49	0,54
Клетки в состоянии апоптоза	67	85	0,67
Клетки с перинуклеарной вакуолью	52	81	0,66

Таблица 3

**Диагностические характеристики цитологических аномалий
при хроническом генерализованном пародонтите лёгкой степе-
ни тяжести**

Показатель	Критическое значение, %	AUC
Клетки с микроядрами	1,2	0,65
Двухядерные клетки	2,2	0,51
Клетки с протрузией	0,8	0,65
Клетки в состоянии апоптоза	2,4	0,70
Клетки с перинуклеарной вакуолью	0,4	0,56

который позволяет рассчитать диагностическую специфичность (ДС) и диагностическую чувствительность (ДЧ) показателей, а также диагностическую эффективность, которая выражается величиной площади под ROC кривой (AUC).

Как следует из приведённых в табл. 2 данных, диагностическая чувствительность выявленных цитологических аномалий невысока, а величина AUC не превышает значения 0,7, что также подтверждает их невысокую диагностическую значимость.

Учитывая, что диагностика тяжёлых форм ХГП чаще всего не вызывает проблем в клинической практике, в отличие от начальных проявлений заболевания, мы проанализировали диагностические характеристики изученных параметров при лёгкой степени ХГП (табл. 3). Критические значения показателей определены с помощью статистической программы MedCalc.

Такой подход позволили выявить, что наиболее значимым показателем в ранней диагностике лёгкой степени ХГП можно считать уровень клеток в состоянии апоптоза с кариопикнозом, кариорексисом и кариолизисом (табл. 3).

Обсуждение. Ранее нами было показано, что у пациентов с ХГП нарушены локальные механизмы иммунореактивности (продукция секреторных иммуноглобулинов, лактоферрина, цитокинов и др.), которые нормализовались после проведения лечебных мероприятий [14, 15]. В данном исследовании установлены реактивные изменения БЭ, которые патогенетически скорее всего взаимосвязаны с указанными выше иммунологическими сдвигами. На основании полученных данных можно заключить, что подсчёт числа клеток с протрузиями, микроядрами и в состоянии апоптоза в БЭ может иметь диагностическое значение при ХГП, а число клеток с деструкцией ядра является достаточно чувствительным критерием начальной стадии (лёгкой степени тяжести) ХГП. Стоит отметить, что поскольку цитологические и кариологические особенности буккальных клеток имеют однонаправленные с активно-

стью заболевания изменения, их можно считать показателями тяжести ХГП.

Снижение активности пролиферативных процессов в сочетании с повышением уровня клеток с дегенеративно-дистрофическими изменениями ядра легко объяснимо механизмами воспаления пародонтальных тканей [16, 17].

Нарастание числа клеток с микроядрами и другими маркерами цитологических нарушений при ХГП ряд авторов связывают не только с активностью воспалительного процесса, но и с другими факторами. К ним относят, в частности, воздействие дентальной рентгенографии на слизистую оболочку полости рта, которой нередко подвергаются пациенты [18, 19]. Кроме того, выраженные цитологические аномалии можно объяснить при тяжёлой степени ХГП «накоплением» воздействия неблагоприятных факторов среды [3, 4], сопутствующих прогрессированию заболевания.

Заключение. Таким образом, цитологическое исследование БЭ - буккальная цитограмма может стать инструментом оценки системных и локальных реакций организма при ХГП, а также одним из методов определения эффективности лечебно-профилактических средств, в частности - в стоматологии [5].

Дальнейшие исследования позволяют установить референсные значения изучаемых показателей и возможность их использования в лабораторном мониторинге пациентов. Такой подход можно считать перспективным в связи с неинвазивным характером данной методики.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания АААА-А18-118042890061-4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–4, 6–13, 16-19
см. REFERENCES)

- Мандра Ю.В., Базарный В.В., Чупахин О.Н., Хонина Т.Г., Семенова Е.А., Светлакова Е.Н. и др. Клинико-морфологическая оценка эффективности применения инновационной лечебно-профилактической зубной пасты в комплексном лечении пациентов молодого возраста с основными стоматологическими заболеваниями. *Проблемы стоматологии.* 2017;13(3): 29-35.
- Базарный В.В., Полушина Л.Г., Ваневская Е.А. Иммунологический анализ ротовой жидкости как потенциальный диагностический инструмент. *Российский иммунологический журнал.* 2014; 8(17): 769-71.
- Базарный В.В., Полушина Л.Г., Семенова Е.А., Шарипова Н.И. Клинико-лабораторная характеристика слизистой оболочки полости рта при пародонтите. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 9: 518.

REFERENCES

- Gashi G., Mahovlić V., Manxhuka-Kerliu S., Podrimaj-Bytyqi A., Gashi L., Elezaj I.R. The association between micronucleus, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds frequency and the degree of uterine cervical lesions. *J. Biomarkers.* 2018; 31:1-9.
- Renaud-Vilmer C., Cavellier-Balloy B. Precancerous lesions of the buccal epithelium. *Ann. Dermatol. Venereol.* 2017;144(2):100-8.
- Saba R., Halytsky O., Saleem N., Oliff I.A. Buccal epithelium, cigarette smoking, and lung cancer. Review of the Literature. *J. Oncology.* 2017; 93: 347-53.
- Shashikala R., Indira A.P., Manjunath G.S., Rao K.A., Akshatha B.K. Role of micronucleus in oral exfoliative cytology. *J. Pharm Bioallied Sci.* 2015;7(2):409-13.
- Mandra Y.Y., Bazarnyi V.V., Chupakhin O.N., Khonina T.G., Sements-

ЦИТОЛОГИЯ

- ova E. A., Svetlakova E. N. et al. Clinico-morphological estimation of efficiency of application of innovative treatment and prophylactic toothpaste in the complex treatment of young patients with basic dental diseases. *Problemy stomatologii* .2017;13(3): 29-35. (in Russian)
6. Benvindo-Souza M., Assis R.A., Oliveira E.A.S., Borges R.E., Santos L.R.S. The micronucleus test for the oral mucosa: global trends and new questions. *Enviro Sci Pollut Res. Int.* 2017; 24(36): 27724-30.
 7. Butt F., Cheema K., Nisar N., Qureshi J. Cytogenetic bio-monitoring in fuel station attendants of Gujrat, Pakistan through buccal micronucleus cytome assay. *J. Pak Med Assoc.* 2017;67(7):1039-44.
 8. Naderi N.J., Pasha M.P. Comparison of cytotoxic effect of cigarette and waterpipe smoking on human buccal mucosa. *International J. of Preventive Medicine.* 2017; 8: 98.
 9. Smitha S., Arul P., Masilamani S., Akshatha C., Naveen Kumar B. Evaluation of micronucleus in exfoliated buccal epithelial cells using liquid-based cytology preparation in petrol station workers. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* 2017; 38(3): 273–6.
 10. Cuello-Almarales D.A., Almaguer-Mederos L.E., Vázquez-Mojena Y., Almaguer-Gotay D., Zayas-Feria P., Laffita-Mesa J.M., González-Zaldívar Y., Aguilera-Rodríguez R., Rodríguez-Estupiñán A., Velázquez-Pérez L. Buccal cell micronucleus frequency is significantly elevated in patients with spinocerebellar ataxia type 2. *Archives of Medical Research.* 2017;48(3):297-302.
 11. Gajaria P.K., Maheshwari U.M., Borkar D.B., Dhar R., Pancholi V. Buccal mucosa exfoliative cell prussian blue stain co-relates with iron overload in β -thalassemia major patients. *Indian Journal Hematology Blood Transfusion.* 2017; 33(4): 559-64.
 12. Khan S., Khan A.U., Hasan S. Genotoxic assessment of chlorhexidine mouthwash on exfoliated buccal epithelial cells in chronic gingivitis patients. *Journal Indian Society Periodontology.* 2016; 20(6): 584-91.
 13. Sahu M., Suryawanshi H., Nayak S., Kumar P. Cytomorphometric analysis of gingival epithelium and buccal mucosa cells in type 2 diabetes mellitus patients. *J. Oral Maxillofac Pathol.* 2017; 21(2): 224-8.
 14. Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Vanevskaya E.A. Immunological assay oral fluid as potential diagnostic tool. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal* .2014;8(17):769-71. (in Russian)
 15. Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Sementsova, E. A., Sharipova N. A. Clinical and laboratory characteristics of the mucous membrane of the oral cavity with periodontitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 9: 518. (in Russian)
 16. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunology.* 2014; 35(1): 3-11.
 17. Silva N., Abusleme L., Bravo D., Dutzan N., Garcia-Sesnich J. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J. Appl Oral.* 2015; 23(3): 329-55.
 18. Gómez-Meda B.C., Ramírez-Aguilar M.Á., Zúñiga-González G.M. Increased micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa and oxidative damage in saliva from patients with chronic and aggressive periodontal diseases. *Journal Periodontal Research.* 2015; 50(1): 28-36.
 19. Zamora-Perez A.L., Ortiz-García Y.M., Lazalde-Ramos B.P., Guerrero-Velázquez C. Buccal mucosa cell damage in individuals following dental X-ray examinations. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 2509.

Поступила 03.09.18

Принята к печати 21.11.18

ИММУНОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:579.881.111-078.33

Штрек С. В.^{1,2}, Рудаков Н. В.^{1,2}, Абрамова Н. В.^{1,2}, Самойленко И. Е.¹, Березкина Г. В.¹, Зеликман С. Ю.^{1,2}, Кумпан Л. В.^{1,2}, Матущенко Е. В.^{1,2}

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ У БОЛЬНЫХ КЛЕЩЕВЫМИ РИККЕТСИОЗАМИ НА ТЕРРИТОРИЯХ РАЗЛИЧНОГО РИСКА ЗАРАЖЕНИЯ *RICKETTSIA SIBIRICA*

¹ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, г. Омск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, 644099, Омск, Россия

Случаи клещевых риккетсиозов в Сибири и на Дальнем Востоке связаны с *R. sibirica* - возбудителем сибирского клещевого тифа (СКТ). В связи с резким сокращением номенклатуры выпускаемых диагностических препаратов и увеличением спектра выявленных на территории России видов риккетсий необходимы новые подходы к лабораторной верификации диагнозов. Представлена оценка эффективности серологических методов исследования (реакция связывания компонента, реакция непрямой иммунофлуоресценции, иммуноферментный анализ) у больных клещевыми риккетсиозами на территориях различного риска заражения *R. sibirica*. Обследованы больные с диагнозом сибирский клещевой тиф с высокоэндемичной территории Республики Алтай и из Называевского района Омской области, где установлено наличие природного очага риккетсиозов группы клещевой пятнистой лихорадки с циркуляцией двух видов патогенных риккетсий - *R. sibirica* и *R. raoultii*. В качестве контрольной группы использовали пробы сывороток крови, полученных в эпидемические сезоны от клинически здоровых людей г. Омска.

Для верификации диагноза сибирского клещевого тифа наиболее приемлемо применение серологических методов, из которых наиболее чувствительным является ИФА, позволяющий выявить антитела в более ранние сроки. В ИФА для подтверждения диагноза первую сыворотку крови можно исследовать только на IgM. Исследование 2-й сыворотки необходимо проводить в ИФА на наличие IgM- и IgG- антител с антигеном *R. sibirica*. РНИФ для исследования парных сывороток следует проводить со специфичными антигенами риккетсий, циркулирующих в данном очаге. В лабораториях, не оборудованных для постановки ИФА, рекомендуется использовать РСК. При нарастании титра в 2 и более раза и обнаружении IgM и IgG во второй сыворотке, с учётом клинических проявлений, диагноз «сибирский клещевой тиф» можно считать подтверждённым.

Результаты исследований свидетельствуют о высокой эффективности серологических методов исследования (РСК, РНИФ, ИФА) и служит обоснованием для их использования в лабораторной диагностике для подтверждения диагноза СКТ.

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

Для цитирования: Штрек С. В., Рудаков Н. В., Абрамова Н. В., Самойленко И. Е., Березкина Г. В., Зеликман С. Ю., Кумпан Л. В., Матущенко Е. В. Оценка эффективности серологических методов для выявления антител у больных клещевыми риккетсиозами на территориях различного риска заражения *Rickettsia sibirica*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (12): 777-782. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2018-63-12-777-782>

Shtrek S. V.^{1,2}, Rudakov N. V.^{1,2}, Abramova N. V.^{1,2}, Samoilenko I. E.¹, Berezkina G. V.¹, Zelikman S. Y.^{1,2}, Kumpan L. V.^{1,2}, Matuschenko E. V.^{1,2}

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF THE SEROLOGICAL METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF ANTIBODIES IN PATIENTS WITH TICK-BORNE RICKETTSIOSIS ON THE TERRITORIES OF A DIFFERENT RISK OF RICKETTSIA SIBIRICA INFECTION

¹Omsk Research Institute of natural focal Infections, 644080, Omsk, Russia;

²Omsk State Medical University, 644050, Omsk, Russia

Cases of tick-borne rickettsiosis in Siberia and the Far East are associated with *R. sibirica*, the causative agent of Siberian tick typhus (STT). In connection with a sharp reduction in the nomenclature of diagnostic products and an increase in the spectrum of species of founding rickettsiae on the territory of Russia, new approaches to the laboratory verification of diagnoses are needed. We present an evaluation of the effectiveness of serological research methods (complement fixation test, indirect immunofluorescence, and ELISA) in patients with tick-borne rickettsioses in areas of different risk of infection with *R. sibirica*. Patients were diagnosed with STT from the highly endemic territory of the Altai Republic and from the Naziyevsky district of the Omsk region, where natural foci of rickettsioses of the spotted fever group was detected with the circulation of two species of pathogenic rickettsia, *R. sibirica* and *R. raoultii*. As a control group, samples of sera from epidemic seasons from clinically healthy people in Omsk were used.

To verify the diagnosis of Siberian tick typhus, the use of serological methods is most appropriate, of which the most sensitive is ELISA, which allows detecting antibodies at an earlier time. In the ELISA for confirmation of the diagnosis, the first serum can be

examined only on IgM. Investigation of the 2nd serum should be performed in ELISA for the presence of IgM and IgG antibodies with R. sibirica antigen. Reaction of indirect immunofluorescence (RNIF) for the study of paired sera should be conducted with specific antigens of rickettsia circulating in this focus. In laboratories not equipped for setting ELISA, it was recommended to use CFT. When the titer increases in two or more times and IgM and IgG are detected in the second serum, taking into account clinical manifestations, the diagnosis of "Siberian tick typhus" can be considered confirmed.

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

For citation: Shtrek S. V., Rudakov N. V., Abramova N. V., Samoylenko I. E., Berezkina G. V., Zelikman S. Y., Kumpan L. V., Mauschenko E. V. Evaluation of the effectiveness of the serological methods for the identification of antibodies in patients with tissue rickettsiosis on the territories of a different risk of Rickettsia sibirica infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (12): 777-782 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2018-63-12-777-782>

For correspondence: Rudakov Nikolay Viktorovich; e-mail: rickettsia@mail.ru

Information about authors:

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

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 28.09.2018
Accepted 20.11.2018

В России для лабораторной диагностики клещевых риккетсиозов (КР) до недавнего времени базовым методом являлась реакция связывания комплемента (РСК), которая характеризуется невысокой чувствительностью [1]. В соответствии с Европейскими рекомендациями для серологической диагностики КР применяется реакция непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ), которую считают «золотым стандартом» серодиагностики риккетсиозов [2]. Для постановки РНИФ используют «слайд-антигены», получаемые на культурах клеток из эталонных штаммов соответствующих видов риккетсий в специализированных риккетсиологических лабораториях [3]. В последние годы в Омском НИИ природно-очаговых инфекций для серологической диагностики риккетсиозов группы КПЛ предложен иммуноферментный анализ (ИФА) на основе цельно-растворимого антигена [4]. Эндемичные по сибирскому клещевому тифу (СКТ) очаговые территории отличаются по риску инфицирования *Rickettsia sibirica* и спектру циркулирующих штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ).

Цель работы – оценить эффективность серологических методов исследования (РСК, РНИФ, ИФА) у больных КР на территориях различного риска заражения *Rickettsia sibirica* для разработки эффективного алгоритма лабораторной диагностики КР.

Материал и методы. Для сопоставления выбраны две территории, существенно отличающихся по эпидемиологическим показателям и переносчикам – республика Алтай, большинство административных территорий которой характеризуются высоким риском инфицирования *R. sibirica*, и Называевский район Омской области с низким риском заражения.

По заболеваемости населения СКТ республика Алтай характеризуются наиболее высокими показателями в РФ, что является проявлением высокой эпидемической активности природных очагов. Основными переносчиками *R. sibirica* являются клещи *Dermacentor nuttalli*. В очагах КР в Алтайском крае, кроме *R. sibirica*, выявлены другие патогенные альфа1-протеобактерии порядка *Rickettsiales* - *R. heilongjiangensis*, *R. raoultii* и *Anaplasma phagocytophilum* [5]. Для клинической картины заболевания СКТ в Республике Алтай характерны острое нача-

ло с синдромом интоксикации, макуло-папулезная сыпь, наличие первичного аффекта (80,3%) и преимущественно среднетяжелое течение болезни. Основной контингент заболевших составляют дети в возрасте 3-14 лет.

В 2003 г. в Называевском районе Омской области первые случаи острого лихорадочного заболевания после присасывания клеща с клиникой КР, с 2006 г. пациенты с подобной симптоматикой выявляются регулярно. У всех больных отмечается лихорадка продолжительностью в среднем неделю, первичный аффект, регионарный лимфаденит, в 70% случаях - розеолезно-петехиальная сыпь. У детей основным клиническим проявлением является регионарный лимфаденит, сопровождающийся субфебрильной или нормальной температурой [6]. С 2009 г. в РСК с антигеном *R. sibirica* у пациентов из Называевского района выявляют сероконверсию к *R. sibirica* в РСК [7]. Места заражения людей находятся в ареале клещей *D. marginatus* и *D. reticulatus*, что объясняет весеннюю и осеннюю сезонность. Из иксодовых клещей, снятых с людей, методом ПЦР с последующим секвенированием ампликонов обнаружена *R. raoultii*. В пробе клещей *D. marginatus* при первичном заражении и исследовании в трёх пассажах на морских свинках идентифицирована *R. sibirica* молекулярно-биологическими методами (ПЦР+секвенирование) [8]. Установлено наличие природного очага риккетсиозов группы КПЛ с циркуляцией двух видов патогенных риккетсий - *R. sibirica* и *R. raoultii* [9].

В качестве *исследуемой группы* в работе обследованы 72 больных, с диагнозом «Сибирский клещевой тиф», находившихся на лечении в инфекционном отделении Называевской ЦРБ в период 2012-2015 гг. Исследованы 45 одиночных и 27 парных сывороток крови, взятых в динамике инфекционного процесса. Все пациенты обследованы на первой – начале второй недели и 2-4 нед заболевания (в среднем на 6,7±3 и на 20,4±5 день болезни).

Контрольная группа состояла из 72 пробы сывороток крови, полученных в эпидемические сезоны 2012-2016 гг., от клинически здоровых людей г. Омска. Сыворотки от 34 больных группы сравнения, с диагнозом «Сибирский клещевой тиф», получены в эпидемический сезон 2017 года из Республики Алтай. Количество парных сывороток равно 22, одиночных 12.

Сыворотки крови пациентов всех трёх групп исследованы на наличие антител к антигену *R. sibirica* в РСК и ИФА. В РНИФ к антигенам *R. sibirica* и *R. raoultii* исследованы сыворотки пациентов исследуемой и контрольной групп (табл. 2).

РСК выполняли микрометодом с «Диагностикум риккетсиозный «Сибирика» сухой для РСК» производства НПО «БИОМЕД», г. Пермь по общепринятой методике [10]. РНИФ осуществляли по стандартной методике, для выполнения использованы корпускулярные антигены *R. sibirica* и *R. raoultii*, приготовленные из клеточных культур, хранящихся в рабочей коллекции Омского НИИ природноочаговых инфекций; иммуноглобулины диагностические флюоресцирующие антивидовые против иммуноглобулинов человека, сухие (НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, г. Москва), с контрастированием препаратов альбумином бычьим, меченным родамином, сухим («МЕДГАМА» ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, г. Москва). Исследование сывороток крови в ИФА проводили экспериментальной тест-системой, разработанной в Омском НИИ природно-очаговых инфекций [11].

За положительный результат принималось наличие специфических антител в любом из трёх методов. По результатам серологических исследований больных исследуемой группы сформированы 2 подгруппы. Серопозитивную подгруппу (50 человек) составили больные с серологическим подтверждением диагноза, среди которых 16 женщин и 34 мужчины в возрасте от 3 до 84 лет (средний возраст $49,3 \pm 21,4$ лет). Подгруппу серонегативных составили 22 больных, у которых диагноз СКТ не имел серологического подтверждения, и выставлен на основании клинико-эпидемиологических данных, из них 10 женщин и 12 мужчин в возрасте от 12 до 76 лет (средний возраст $53,4 \pm 18,6$ лет).

Результаты и обсуждение. У пациентов исследуемой группы независимо от результатов серологического обследования инфекция протекала типично. Всё это в сочетании с эпидемическим сезоном и наличием у подавляющего большинства (76,3%) факта присасывания клеща позволило всем больным поставить клинический диагноз сибирский клещевой тиф.

Преобладали взрослые (68,1±5%) в возрасте от 40 до 70 лет. Инкубационный период колебался в пределах 1-20 дней (в среднем $5,7 \pm 6,9$). Первичный комплекс в виде корочки, инфильтрата, регионарного лимфаденита не всегда представлен всеми его признаками. Другим типичным признаком являлась сыпь. Симптомы интоксикации разной выраженности отмечались у всех пациентов. У некоторых больных наблюдалось повышение аланинаминотрансферазы (АлТ) и аспаратаминотрансферазы (АсТ).

Изменения со стороны периферической крови на высоте заболевания сводились к лейкоцитозу у части пациентов (38,9%), из них 96,4% из подгруппы серопозитивных, либо к лейкопении (5,6%). Относительная лимфопения выявлена у 12,5% больных, нейтрофилов – у 11,1%. Повышение СОЭ отмечено у 55,6% больных.

У пациентов серопозитивной подгруппы на месте присасывания клеща чаще выявлялась корочка и инфильтрат на месте первичного аффекта, инкубационный период больше на сутки, отмечались слабость и увеличение селезёнки. В подгруппе серонегативных было больше пожилых пациентов, и несмотря на отсутствие антител к возбудителю, отмечены характерные для КР клинические проявления. «Серонегативность» может

быть связана с рядом причин. Во-первых, ранние сроки серологического обследования и недостаточная чувствительность используемых методов. Во-вторых, циркуляция в очаге *R. raoultii* – этиологического агента синдрома TIBOLA. Клинические проявления риккетсиоза, вызванного *R. raoultii*, выражены значительно слабее, чем при «классическом» клещевом риккетсиозе, обусловленном *R. sibirica*, генерализация процесса и, соответственно, выработка антител менее выражена [12, 13].

В группе сравнения наблюдались преимущественно дети (85,3%). Инкубационный период длился 3-4 суток. У половины (47,1%) больных отмечен первичный аффект, повышение температуры в среднем до $38,9^\circ\text{C}$. Сыпь одинаково часто отмечена как у серонегативных (86,7%), так и серопозитивных (89,5%), у серонегативных сыпь появляется позже на 1 день. Полученные данные совпадают с клинической картиной СКТ в Республике Алтай, описанной ранее [14].

Методом РСК исследовано 123 одиночных и 55 парных сывороток, из них положительных 1 и 25 соответственно. В исследуемой группе риккетсиозные антитела выявлены в 19 парных сыворотках и в 5 сыворотках в группе сравнения. Одна одиночная положительная сыворотка была только в группе сравнения.

Проанализировав данные о сроке после присасывания клеща до взятия первой сыворотки у 20 больных получили следующее: антитела к антигену *R. sibirica* в РСК выявлялись с 7 дня в титре 1/20, и обнаруживаются ещё на 65 день. Максимальные титры (1/160-1/320) антител в сыворотке выявляются в промежутке с 31 по 52 дни. Данная картина характерна для лиц старше 40 лет. О сроках выявления антител у детей недостаточно данных, что не позволяет сделать определённых выводов по этому вопросу. Клиническая картина у серопозитивных в РСК пациентов типичная, с наличием первичного аффекта в месте входных ворот, пятнисто-папулезной сыпи, гепатолиенального и умеренного токсического синдрома.

Чувствительность и специфичность для РСК рассчитывали отдельно для первых и для парных сывороток (табл. 1). Чувствительность при расчёте для первых проб составила 5,6%, специфичность 100%, при исследовании парных сывороток чувствительность составила 25,5%.

Анализ полученных данных позволил заключить, что метод РСК недостаточно чувствителен на ранних стадиях заболевания. Для подтверждения диагноза «сибирский клещевой тиф» у больных необходимо тестировать сыворотку крови после 10 дня после присасывания клеща или не ранее 4-7 дней заболевания. Исследования первой сыворотки недостаточно; в связи с низкой чувствительностью существует вероятность получения ложноотрицательного результата. Необходимо исследовать парную сыворотку, для обнаружения нарастания титра антител, взятие которой целесообразно проводить с 14 по 21 день болезни.

В ИФА исследовано 234 сывороток: 123 одиночных, 55 парных. В исследуемой группе больных с типичной клинической картиной СКТ с помощью ИФА в 68,1% проб удалось выявить антитела класса IgM и/или IgG к антигену *R. sibirica*. При анализе парных сывороток антитела класса IgM выявлены в среднем в 68,5% сывороток крови (чаще во второй, чем в первой – 73,1% и 58,3% соответственно); IgG к *R. sibirica* – в среднем в

Таблица 1

Диагностическая эффективность серологических методов для обнаружения антител к риккетсиям

Объект исследования	Вид антигена	Больные* (n=106)		Здоровые** (n=72)		Характеристики теста			
		«+» (a)	«-» (c)	«+» (b)	«-» (d)	Se,% a/(a+c)	Sp,% d/(b+d)	PV+,% a/(a+b)	PV-% d/(c+d)
Первые сыворотки	РСК	6	100	0	72	5,6	100	100	41,9
	РНИФ с Ag <i>R. sibirica</i>	5	27	0	6	15,6	100	100	22,9
	РНИФ с Ag <i>R. raoultii</i>	5	29	0	3	14,7	100	100	23,7
	ИФА	52	51	0	72	50,5	100	100	56,8
Все сыворотки	РСК	27	79	0	72	25,5	100	100	47,3
	РНИФ с Ag <i>R. sibirica</i>	11	21	0	6	34,4	100	100	27,6
	РНИФ с Ag <i>R. raoultii</i>	11	23	0	3	32,4	100	100	25,8
	ИФА	68	38	0	72	64,2	100	100	63,1

Примечание. * – диагноз установлен на основании типичной клинической картины клещевого риккетсиоза; ** - практически здоровые пациенты.

Таблица 2

Частота обнаружения методом ИФА антител к антигену *R. sibirica* в сыворотках крови пациентов исследуемой группы и группы сравнения

Объект исследования	Класс иммуноглобулинов	Исследуемая группа				Группа сравнения			
		1-я сыворотка	2-я сыворотка	всего	%	1-я сыворотка	2-я сыворотка	всего	%
Одиночная сыворотка	IgM	10		10	22,2±6,3	9		9	75,0±13,1
	IgG	10		10	22,2±6,3	1		1	8,3± 8,3
	IgM+IgG	5		5	11,1±4,7	0		0	0±24,2
	Количество исследованных сывороток	45		45	100	34		12	100
Парная сыворотка	IgM	10	11	24*	44,4±6,8	7	15	22*	48,9±7,5
	IgG	3	4	7*	13,0±4,6	0	0	0	0±7,9
	IgM+IgG	4	8	13*	24,1±5,9	0	0	0	0±7,9
	Количество исследованных сывороток	24	26	54	100	22	22	45*	100

Примечание. * - включены и 3-и сыворотки.

37,0% сывороток крови (чаще во второй, чем в первой – 46,2% и 29,2% соответственно) (табл. 2).

В группе сравнения положительные сыворотки в 94,7% представлены IgM. В парных сыворотках в 68,2% IgM выявляется во второй сыворотке (аналогичная картина в исследуемой группе). В одной первой пробе выявлен IgG, что может быть связано с более поздним забором материала для исследования. В контрольной группе все сыворотки отрицательные.

Для анализа времени выработки антител проанализированы данные 32 пациентов с известными датами присасывания клеща и забора материала. Обнаружение IgM возможно с пятого дня после присасывания в титре 1:100, в то время как IgG выявляется на 7 день в титре 1:50. Максимальные значения IgM отмечается с 8 по 12 день, для IgG с 14 по 30 день. Обнаружение IgM-антител в сыворотке больного указывает на текущую или недавно перенесённую инфекцию. Нами IgM обнаружен на 65 день, иногда в низких концентрациях он сохраняется после 12 мес от момента инфицирования [15].

Аналогично для ИФА рассчитаны чувствительность и специфичность (табл. 1). Установлено, что высокая чувствительность (81,6%) достигается при исследовании парных сывороток. Специфичность при этом равна 100%. Но при анализе всех сывороток значения специфичности равняется 90,3%. В ИФА выявляются пере-

крестные реакции, характерные для IgM, к различным антигенам риккетсий группы КПЛ [4]. Для повышения качества результатов ИФА рекомендуется использовать антигены риккетсий, циркулирующих в эндемичном регионе.

Сопоставлены результаты лабораторного подтверждения СКТ с помощью ИФА с результатами серологической верификации с помощью РСК у 27 больных СКТ, сыворотки крови которых параллельно исследованы в ИФА и РСК с коммерческим диагностикумом *R. sibirica* (табл. 3).

При исследовании парных сывороток в РСК подтвердили диагноз в 66,7%, с помощью ИФА на IgM – в 70,4% и в результате сочетанного применения РСК и ИФА и на IgM и на IgG – 85,2% случаев. Для подтверждения диагноза первую сыворотку достаточно исследовать на наличие IgM, вторую на антитела обоих классов иммуноглобулинов.

При сравнительной оценке двух методик установлено, что оба метода обладают высокой специфичностью, однако, РСК уступает ИФА в чувствительности.

Из 42 сывороток, исследованных в РНИФ с антигеном *R. sibirica*, положительные результаты выявлены в 13 пробах. В 46,2% положительный результат выявлен во второй сыворотке. С антигеном *R. raoultii* исследовано 43 сыворотки, из них 11 положительных (63,6% выявлены в

Таблица 3

Анализ совпадений результатов серологической верификации диагноза СКТ у больных исследуемой группы при использовании ИФА и РСК

Алгоритм применения ИФА	Всего больных	ИФА+		РСК+		Совпадения положительных результатов ИФА и РСК, %	Совпадения отрицательных результатов ИФА и РСК, %
		абс.	%	абс.	%		
ИФА на IgM (1-я проба)	27	14	51,9±9,8	4	14,8±6,9	28,6±12,5	100
ИФА на IgM (парные пробы)	27	19	70,4±8,9	18	66,7±9,3	94,7±5,3	100
ИФА на IgM (парные пробы) и ИФА на IgG (парные пробы)	27	23	85,2±6,9	18	66,7±9,3	78,3±9,0	100

Таблица 4

Анализ совпадений результатов серологической верификации диагноза СКТ у больных исследуемой группы при использовании РНИФ с антигенами *R. sibirica* и *R. raoultii*, ИФА и РСК

Количество проб	Из них положительных в РСК с антигеном <i>R. sibirica</i>		Из них положительных в ИФА с антигеном <i>R. sibirica</i>		Из них положительных в РНИФ с антигеном <i>R. sibirica</i>		Из них положительных в РНИФ с антигеном <i>R. raoultii</i>	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
20	12	60,0±11,2	17	85,0±8,2	11	55,0±11,4	7	35,0±10,9

парной сыворотке). При исследовании всех сывороток с двумя антигенами, чувствительность в среднем составила 33,4±1%, специфичность 84,5±4,5% (см. табл. 1).

В исследуемой группе отобраны 20 обследованных тремя методами, в РНИФ с разными антигенами (табл. 4). В ИФА антитела обнаружены в 85,0%, в РНИФ с антигеном *R. sibirica* в 55,0%, с антигеном *R. raoultii* в 35,0%. Все положительные в РНИФ с антигеном *R. sibirica* в 100% случаев положительны в РСК и ИФА. У 80% больных с высокими титрами антител в РНИФ к антигену *R. sibirica* первичный аффект представлен не полностью, чаще (60%) отсутствовал лимфаденит. Всего у одного пациента проба положительна к антигену *R. raoultii* и отрицательна к *R. sibirica*, где клиническая картина представлена полностью всеми признаками.

Заключение и практические рекомендации. Для верификации диагноза СКТ наиболее приемлемо применение серологических методов, из которых наиболее чувствительным является ИФА, позволяющий выявить антитела в более ранние сроки. В связи с наличием перекрестно-реагирующих антигенных детерминант у разных видов риккетсий ни ИФА, ни РНИФ не обладают видоспецифичностью.

Взятие первой пробы крови осуществлять после выявления заболевания на 4-7 день, вторую пробу с 14-18 день заболевания, третью (при необходимости) после 25 дня от начала заболевания.

В ИФА для подтверждения диагноза первую сыворотку крови можно исследовать только на IgM. Исследование 2-й сыворотки необходимо проводить в ИФА на наличие IgM- и IgG-антител с антигеном *R. sibirica*. РНИФ для исследования парных сывороток следует проводить со специфичными антигенами патогенных риккетсий, циркулирующих в данном очаге. В лабораториях, не оборудованных для постановки ИФА, рекомендуется использовать РСК.

Результаты исследований свидетельствуют о высокой эффективности серологических методов исследования (РСК, РНИФ, ИФА) и служат обоснованием для их использования в лабораторной диагностике для подтверждения диагноза СКТ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 15 см. REFERENCES)

1. 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.
2. Кумпан Л.В., Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Красиков А.П., Абрамова Н.В., Решетникова Т.А. и др. Получение и экспериментальное изучение антигенов клещевых α -протеобактерий. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014; 12 (261): 36-9.
3. Абрамова Н.В., Рудаков Н.В., Пеньевская Н.А., Седых Н.Н., Кумпан Л.В., Самойленко И.Е. и др. Аprobация иммуноферментного анализа для серологической диагностики инфекций, вызываемых риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 1 (50): 17-21.
4. Шпынов С.Н., Арсеньева И.В., Гранитов В.М., Рудаков Н.В. Клещевой риккетсиоз в Алтайском крае: эпидемиологические аспекты, молекулярно-биологическая верификация. *Сибирский медицинский журнал*. 2008; 7 (82): 43-6.
5. Самойленко И.Е., Решетникова Т.А., Шаламова Е.В., Кумпан Л.В., Лебедева М.А., Танцев А.К. и др. Новый очаг клещевого риккетсиоза в Называевском районе Омской области. *Национальные приоритеты России*. 2011; 2 (5): 141-2.
6. Самойленко И.Е., Рудаков Н.В., Решетникова Т.А., Егембердиева Р.А., Шаламова Е.В., Штрек С.В. и др. Результаты выявления антител к риккетсиям в сыворотках крови пациентов Омской области и Западно-Казахстанской области Республики Казахстан. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 1 (80): 36-8.
7. Самойленко И.Е., Решетникова Т.А., Иголкина Я.П., Околелова Н.А., Коломеец А.Н., Шаламова Е.В. и др. Результаты микробиологических и молекулярно-биологических исследований в сочетании очаге клещевых риккетсиозов в Омской области. *ЗНУСО*. 2016; 11 (284): 19-21.
8. Березкина Г.В., Штрек С.В., Зеликман С.Ю., Боброва О.А., Околелова Н.А., Коломеец А.Н. и др. Комплексное выявление возбудителей природно-очаговых инфекций методом ПЦР в снятых с людей переносчиках в Омской области. *Национальные приоритеты России*. 2016; 4 (22): 78-85.
9. Методические рекомендации. *Профилактика клещевых риккетсиозов*. Омск: Омский НИИ природно-очаговых инфекций; 2014.

11. Рудаков Н.В., Абрамова Н.В., Пенъевская 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.
12. 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.
13. Иголкина Я.П., Рар В.А., Епихина Т.И., Тикунов 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.
14. Рудаков Н.В., Оберт А.С. *Клещевой риккетсиоз*. Омск: Издательско-полиграфический центр ОГМА; 2001.
7. Samoylenko I.E., Rudakov N.V., Reshetnikova T.A., Egemberdyeva R.A., Shalamova E.V., Shtreck S.V. et al. The results of detection of antibodies to rickettsiae in blood serum of patients in the Omsk region and the West Kazakhstan region of the Republic of Kazakhstan. *Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika*. 2015; 1 (80): 36-8. (in Russian)
8. Samoylenko 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. *ZNiSO*. 2016; 11 (284): 19-21. (in Russian)
9. Berezkina G.V., Shtreck S.V., Zelikman S.Y., Bobrova O.A., Okolelova N.A., Kolomeyetz A.N. et al. Complex detection of pathogens of natural focal infections by the method of PCR in ticks taken from people in the Omsk region. *Nacionalnye prioritety Rossii*. 2016; 4 (22): 78-85. (in Russian)
10. *Methodical recommendations. Prevention of tick-borne rickettsiosis: guidelines*. Omsk: Omskij NII prirodno-ochagovykh infekcij, 2014. (in Russian)
11. Rudakov N.V., Abramova N.V., Penyevskaya N.A., Samoylenko 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)
12. Rudakov N.V., Samoylenko I.E., Rudakova S.A., Kumpan L.V., Belan Y.B., Reshetnikova T.A. et al. About the role of *Rickettsia raoultii* in the epidemiology of tick-borne rickettsioses in Russia. *Medicinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni* 2015; 3: 17-21. (in Russian)
13. Igolkina Y.P., Rar V.A., Epihina T.I., Tikunov A.Y., Krasnova E.I., Provorova V.V. et al. Revealing of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia sibirica* DNAs in the blood and liquor of patients in Western Siberia. *Nacionalnye prioritety Rossii*. 2016; 4 (22): 85-8. (in Russian)
14. Rudakov N.V., Obert A.S. *Tick-borne rickettsiosis*. Omsk: Izdatel'sko-poligraficheskij centr OGMA; 2001. (in Russian)
15. Halle S., Gash G.A. Use of a sensitive microplate enzyme like immunosorbent assay in a retrospective serological analysis of a laboratory population at risk to infection with typhus group rickettsia. *J. Clin. Microbiol.*, 1980; 12: 343-50.

Поступила 28.09.18

Принята к печати 20.11.18

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:579.871]-078

Чагина И.А.¹, Борисова О.Ю.¹, Гадуа Н.Т.¹, Афанасьев М.С.², Афанасьев С.С.¹, Скворцов А.Г.³

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЖИДКОЙ ТРАНСПОРТНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЗЯТИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДИФТЕРИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава РФ, 119991, Москва, Россия;

³ЗАО «ФИРМА ГАЛЕН», 125373, Москва, Россия

Основной задачей лабораторной диагностики дифтерийной инфекции является идентификация возбудителя дифтерии с помощью минимального количества диагностических тестов для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки. Одним из важнейших этапов является взятие и доставка патологического материала, от которого зависит эффективность проведения и своевременность выдачи окончательного ответа. Учитывая появление на рынке коммерческих жидких транспортных сред, представляется целесообразным оценить их эффективность для диагностики дифтерии. В настоящей работе проведены экспериментальные исследования, позволяющие прогнозировать эффективность использования коммерческой транспортной жидкой среды «Тупферы для мазков в пробирке со средой Эймса без угля» (Σ -Transwab® с жидкой средой Эймса) в двух системах – со стандартным аппликатором (система 1) и с тонким удлиненным тампоном для отбора проб из узких полостей – уретральных и назофарингеальных (система 2). В исследовании использовали контрольный токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae* биовара *gravis* № 665. В эксперименте «имитировали» условия работы лечебно-профилактических организаций по хранению тампонов с патологическим материалом на дифтерию до их транспортировки в лабораторию – на столе при комнатной температуре (6 и 20 часов), в холодильнике (6 и 20 часов), в термостате (6 и 20 часов). После инкубации все тампоны засеивали на кровяно-теллуритовую среду для первичного посева патологического материала. Учет результатов проводили через 24 и 48 часов роста. Установлено, что коммерческая транспортная жидкая среда Эймса может быть использована для взятия патологического материала на дифтерию во второй половине рабочего дня при хранении в условиях холодильника. Вместе с тем, следует учитывать форму тампона, так как лучшие результаты по высеваемости возбудителя дифтерии были получены при использовании универсального тампона.

Ключевые слова: взятие материала; тампоны; преаналитический этап исследования; транспортная жидкая среда Эймса; диагностика дифтерии.

Для цитирования: Чагина И.А., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Афанасьев М.С., Афанасьев С.С., Скворцов А.Г. Возможности применения жидкой транспортной среды для взятия патологического материала при лабораторной диагностике дифтерийной инфекции. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (12): 783-787. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-783-787>

Chagina I.A.¹, Borisova O.Yu.¹, Gadua N.T.¹, Afanasiev M.S.², Afanasiev S.S.¹, Skvortsov A.G.³

POSSIBILITIES OF APPLICATION OF THE LIQUID TRANSPORT MEDIUM FOR CAPTURE OF PATHOLOGICAL MATERIAL AT LABORATORY DIAGNOSIS OF THE DIPHTHERIA INFECTION

¹G.N. Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation;

²I.M. Sechenov Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russian Federation;

³«Galen», 125373, Moscow, Russian Federation

The main objective of laboratory diagnosis of a diphtheria is identification of the causative agent by means of the minimum quantity of diagnostic tests for obtaining the authentic answer in the most short time. One of the major stages is capture and delivery of pathological material on which the efficiency of carrying out and timeliness of issue of the final answer depends. Considering emergence in the market of commercial liquid transport mediums, assessment of their efficiency for diagnosis of diphtheria is advisable. In the real work the pilot studies allowing to predict efficiency of use of the commercial transport liquid medium Σ -Transwab® with the liquid medium of Ames in two systems – with the standard applicator (system 1) and with the thin extended tampon for sampling from narrow cavities – urethral and nazofarengialny are conducted (system 2). In a research used a control toxigenic strain of *Corynebacterium diphtheriae* of a biovar of *gravis* No. 665. In an experiment “imitated” operating conditions of the medical organizations for storage of tampons with pathological material on diphtheria before their transportation in laboratory – on a table at the room temperature (6 and 20 hours), in the refrigerator (6 and 20 hours), in the thermostat (6 and 20 hours). After an incubation all tampons sowed the environment for primary crops of pathological material on a blood tellurite agar. Accounting of results was carried out in 24 and 48 hours of growth. It is established that the commercial

transport liquid medium of Ames can be used for capture of pathological material on diphtheria in the second half of the working day at storage in the conditions of the refrigerator. At the same time, it is necessary to consider a tampon form as the best results on a identification of the causative agent of diphtheria have been received when using a universal tampon.

Key words: *material capture; tampons, preanalytic investigation phase; transport liquid medium of Ames; diagnosis of diphtheria.*

For citation: Chagina I.A., Borisova O.Yu., Gadua N.T., Afanasiev M.S., Afanasiev S.S., Skvortsov A.G. Possibilities of application of the liquid transport medium for capture of pathological material at laboratory diagnosis of a diphtheria infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (12): 783-787 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-783-787>

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

Information about authors:

Chagina I.A. <https://orcid.org/0000-0003-2867-9548>
Gadua N.T. <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>
Afanasiev S.S. <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>

Borisova O.Yu. <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>
Afanasiev M.S. <https://orcid.org/0000-0003-4061-1407>
Skvortsov A.G. <https://orcid.org/0000-0002-9213-2224>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 23.11.2018
Accepted 10.12.2018

Введение. Дифтерия является воздушно-капельной бактериальной инфекцией, управляемой средствами массовой иммунизации, которая в Российской Федерации проводится с 1959 г. с целью снижения заболеваемости и летальности. Достигнутые результаты подтвердили значимость массовой специфической иммунопрофилактики среди населения для поддержания в стране санитарно-эпидемиологического благополучия по этой инфекции [1 - 3].

В течение первого десятилетия нынешнего столетия заболеваемость дифтерией оставалась на спорадическом уровне с ежегодным снижением числа заболевших. За последние 16 лет (2001 - 2016 гг.) показатели заболеваемости снизились в 63 раза (с 0,63 до 0,0007 случаев на 100 тыс. населения) [3]. В 2017 г. заболевших дифтерией не зарегистрировано и выявлено 2 бактерионосителя. Однако актуальность проблемы дифтерийной инфекции в условиях единичных случаев по сей день сохраняется [1-3]. Поддержанию эпидемического процесса при этой инфекции способствует наличие скрытых источников инфекции, когорты восприимчивых лиц и бактерионосительство, которое является резервуаром возбудителя и поддерживает его существование как биологического вида [2, 3]. Поэтому, в условиях спорадической заболеваемости и роста числа непривитых лиц, главная роль в распространении инфекции отводится бактерионосителям токсигенных коринебактерий.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Центров по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) в Иране, Непале, Пакистане, Индии, Индонезии, Гане, Бразилии, Гаити, Доминиканской Республике дифтерия по сей день остается эндемичным заболеванием, также регистрируются локальные вспышки в Таиланде, Лаосе и странах Африки [4, 5]. В странах Европы появились сообщения о случаях заболевания дифтерией среди мигрантов и туристов, посетивших эндемичные по этой инфекции территории [5]. Поэтому, учитывая рост числа туристических поездок, увеличивается риск возникновения и завозных случаев дифтерии на территорию нашей страны.

Система бактериологической диагностики дифтерии, используемая на территории Российской Федерации,

создавалась и разрабатывалась на протяжении многих лет несколькими поколениями исследователей и практических микробиологов, среди которых ведущая роль принадлежит сотрудникам МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Бактериологическое исследование проводят с целью лабораторной диагностики дифтерии, выявления источников инфекции, подтверждения эпидемиологических связей и наблюдения за распространением токсигенных коринебактерий дифтерии.

Одним из важнейших этапов бактериологического исследования, от которого зависит эффективность проведения и своевременность выдачи окончательного ответа, является преаналитический этап – взятие и доставка патологического материала. Правильность осуществления этого этапа определяет 80% эффективности самого бактериологического исследования и своевременность выдачи окончательного ответа. Взятие патологического материала на дифтерию осуществляется двумя сухими стерильными тампонами, которые должны быть доставлены в бактериологическую лабораторию в течение 3 часов. Соблюдение этих условий возможно только если материал у пациента забирается в первой половине рабочего дня. Вместе с тем, взятие патологического материала на дифтерию в лечебно-профилактических организациях производится в течение всего рабочего дня. В связи с этим, с целью предотвращения потери патологического материала взятие его допускается в жидкие транспортные среды, приготовленные в лабораторных условиях, с последующим его термостатированием и доставкой в лабораторию на следующий день.

Учитывая расширение рынка транспортных сред и применение автоматизированных бактериологических комплексов, представляется целесообразным оценить эффективность использования коммерческих жидких транспортных сред для диагностики дифтерии.

Цель данной работы – провести сравнительные экспериментальные исследования, позволяющие прогнозировать эффективность бактериологической диагностики дифтерийной инфекции при использовании коммерческой жидкой транспортной среды.

Материал и методы. В исследовании использовали контрольный токсигенный штамм *Corynebacterium diphtheriae* (C.diphtheriae) биовара *gravis* № 665, по-

лученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – ОБОЛЕНСК», который регламентирован действующими методическими указаниями по лабораторной диагностике дифтерийной инфекции (МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции») в качестве контрольного штамма при проверке качества питательных сред для первичного посева патологического материала.

Бактериальную культуру *C.diphtheriae* выращивали на кровяно-теллуритовом агаре (КТА) на основе 2 % агара (ГРМ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 7 % крови крупного рогатого скота (ООО «Лей-Тран», Москва) и 0,02 % теллурита калия (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с инкубацией при температуре 37 °С в течение 24 часов. В качестве коммерческой транспортной жидкой среды использовали «Тупферы для мазков в пробирке со средой Эймса без угля» (Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса) производства Medical Wire & Equipment Co. (Bath) Ltd., Великобритания (MWE). Тестировали две системы. Первая система представляет собой стерильную пробирку с резьбовой крышкой фиолетового цвета, содержащей 1 мл жидкой среды Эймса, и стандартного аппликатора с тампоном Σ-Swab®. Тампон изготовлен из ячеистого пенополиуретана (система 1, фиолетовый цвет). Вторая система представляет собой тупфер Σ-Transwab®, состоит из пробирки с резьбовой крышкой оранжевого цвета, содержащей 1,0 мл жидкой среды Эймса, и аппликатора с тонким удлиненным тампоном Σ-Swab® для отбора проб из узких полостей – для уретральных и назофарингеальных проб. Тампон изготовлен из ячеистого пенополиуретана (система 2, оранжевый цвет). На внутренней стороне крышек имеется приспособление для надежного закрепления зонда. Пробирка совместима со всеми типами современных автоматических систем. Комплект стерильный, индивидуально упакован. После взятия патологического материала тампон при помещении в пробирку плотно фиксируется в крышку, предотвращая его перемещение.

Результаты и обсуждение. С целью оценки эффективности применения жидкой транспортной среды для взятия и транспортирования патологического материала на дифтерию готовили линейки последовательных десятикратных разведений (табл. 1) бактериальной культуры контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665 в стерильном физиологическом растворе в соответствии со стандартным образцом 10 ЕД

мутности (ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава РФ) в соответствии с МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

В работе использовали пять разведений бактериальной культуры в концентрациях - 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 и 10^3 м.к./мл, два последних из которых, согласно действующим нормативно-методическим документам, применяются при проведении контроля качества питательных сред для первичного посева патологического материала. Все разведения контролировали путем высева по 100 мкл из каждого разведения на кровяно-теллуритовую среду. Засеянные чашки инкубировали при 37 °С в течение 24 – 48 ч и подсчитывали число выросших колоний (КОЕ / мл) (табл. 1). Для чистоты проведения эксперимента готовили три линейки последовательных разведений бактериальной культуры типового контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665.

В связи с отсутствием проб биологического материала, полученного от больных дифтерией, модельные эксперименты проводили на иммитантах клинических образцов. Иммитанты готовили следующим образом. В лабораторных условиях на тампоны, используя стерильный наконечник с аэрозольным барьером, наносили (пулировали) 100 мкл бактериальной взвеси типового контрольного токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665 с различной концентрацией м.к. в 1 мл (табл. 1).

Бактериальную взвесь микробов каждой концентрации наносили (пулировали) на два вида тампонов из коммерческой системы (система 1, фиолетовый цвет и система 2, оранжевый цвет) с последующим помещением в транспортную жидкую среду Эймса (Σ-Transwab® с жидкой средой Эймса). Для чистоты эксперимента пулировали по три тампона из каждой концентрации микробной взвеси токсигенного штамма *C.diphtheriae*. В эксперименте «имитировали» условия работы лечебно-профилактических организаций по хранению тампонов с патологическим материалом на дифтерию до их транспортировки в бактериологическую лабораторию – на столе при комнатной температуре (6 и 20 ч), в холодильнике (6 и 20 ч), в термостате (6 ч) и в термостате до утра (20 ч). После пулирования бактериальной взвеси, первую партию тампонов в жидкой транспортной среде оставляли на столе при комнатной температуре до вечера (6 ч); вторую часть тампонов - на столе при комнатной температуре до утра (20 ч); третью партию тампонов - в холодильнике до вечера (6 часов); четвертую партию тампонов - в холодильнике до утра (20 ч); пятую партию тампонов помещали в термостат при 37°С до вечера (6 ч); шестую партию тампонов - в термостат при 37°С до утра (20 ч). После инкубации все тампоны засеивали на кровяно-теллуритовую среду для первичного посева патологического материала. Учет культурально-морфологических свойств выросших колоний проводили через 24 и 48 ч роста, согласно МУК 4.2.3065-13 раздела контроля качества питательных сред для первичного посева патологического материала, где питательная среда считается пригодной для использования при наличии роста колоний из концентрации 5×10^3 и единичных колоний из концентрации 10^3 . Разведения 5×10^6 , 5×10^5 и 5×10^4 высевали для контроля потери материала (табл. 2).

Проведенные исследования показали (табл. 2), что

Таблица 1

Схема приготовления разведений и учет КОЕ / мл токсигенного штамма *C.diphtheriae* биовара *gravis* № 665

Разведение	Количество м.к. в 1 мл взвеси бактериальной культуры по стандарту мутности (10 МЕ)	Число колониеобразующих единиц в 1 мл взвеси бактериальной культуры (КОЕ / мл) 24 часов/48 часов
- 1	5×10^8	Сплошной рост/ Сплошной рост
- 2	5×10^7	Сплошной рост/ Сплошной рост
- 3	5×10^6	Сплошной рост/ Сплошной рост
- 4	5×10^5	Сплошной рост/ Сплошной рост
- 5	5×10^4	Сплошной рост/ Сплошной рост
- 6	5×10^3	$2,95 \times 10^3$ / $3,3 \times 10^3$
- 7	10^3	$4,7 \times 10^2$ / $4,8 \times 10^2$

Таблица 2

Результаты оценки эффективности применения жидкой транспортной среды для взятия и транспортирования патологического материала на дифтерию

Концентрация бактериальной культуры	Тупфер с жидкой средой Эймса и стандартным аппликатором (система 1, фиолетовый цвет). 24 ч / 48 ч	Тупфер с жидкой средой Эймса и аппликатором с тонким удлиненным тампоном для отбора проб из узких полостей (система 2, оранжевый цвет). 24 ч / 48 ч
При комнатной температуре 6 ч		
5×10 ⁶	Сплошной рост / Сплошной рост	Сплошной рост / Сплошной рост
5×10 ⁵	9,43×10 ³ / 1,1×10 ⁴	3,2×10 ³ / 4,3×10 ³
5×10 ⁴	1,45×10 ³ / 2,04×10 ³	2,8×10 ³ / 3,88×10 ³
5×10 ³	1,6×10 ² / 2,5×10 ²	7×10 ¹ / 8×10 ¹
10 ³	3×10 ¹ / 4×10 ¹	0 / 1×10 ¹
В холодильнике при 4°C 6 ч		
5×10 ⁶	Сплошной рост / Сплошной рост	Сплошной рост / Сплошной рост
5×10 ⁵	Сплошной рост / Сплошной рост	2,8×10 ³ / 3,84×10 ³
5×10 ⁴	2,85×10 ³ / 2,87×10 ³	1,5×10 ³ / 1,7×10 ³
5×10 ³	4,2×10 ² / 4,6×10 ²	1×10 ¹ / 1×10 ¹
10 ³	1,1×10 ² / 1,4×10 ²	0 / 0
В термостате при 37°C 6 ч		
5×10 ⁶	Сплошной рост / Сплошной рост	1,5×10 ⁴ / 1,58×10 ⁴
5×10 ⁵	2,31×10 ³ / 2,95×10 ³	1,58×10 ³ / 1,6×10 ³
5×10 ⁴	3,3×10 ² / 3,5×10 ²	1,7×10 ³ / 1,8×10 ³
5×10 ³	9×10 ¹ / 1×10 ²	5×10 ¹ / 7×10 ¹
10 ³	0 / 3	0 / 0
При комнатной температуре 20 ч		
5×10 ⁶	1,03×10 ³ / 1,62×10 ³	1,5×10 ² / 1,7×10 ²
5×10 ⁵	1,2×10 ² / 1,4×10 ²	0 / 4×10 ¹
5×10 ⁴	1×10 ¹ / 1,3×10 ¹	0 / 2×10 ¹
5×10 ³	0 / 6	0 / 0
10 ³	0 / 0	0 / 0
В холодильнике при 4°C 20 ч		
5×10 ⁶	Сплошной рост / Сплошной рост	Сплошной рост / Сплошной рост
5×10 ⁵	Сплошной рост / Сплошной рост	2,3×10 ³ / 2,6×10 ³
5×10 ⁴	1,36×10 ³ / 1,58×10 ³	1,5×10 ³ / 1,57×10 ³
5×10 ³	2,4×10 ² / 2,6×10 ²	5×10 ¹ / 5×10 ¹
10 ³	4×10 ¹ / 6×10 ¹	1×10 ¹ / 1×10 ¹
В термостате при 37°C 20 ч		
5×10 ⁶	0 / 0	0 / 0
5×10 ⁵	0 / 0	0 / 0
5×10 ⁴	0 / 0	0 / 0
5×10 ³	0 / 0	0 / 0
10 ³	0 / 0	0 / 0

хранение материала при использовании тонкого тампона в системе 2 при комнатной температуре в течение 6 часов приводило к снижению высеваемости как в высоких концентрациях микробной взвеси токсигенного штамма *C. diphtheriae* - 5×10⁵ (3,2×10³ / 4,3×10³), 5×10⁴ (2,8×10³ / 3,88×10³), так и в низкой - 5×10³ (7×10¹ / 8×10¹) и к потере в концентрации 10³ (0 / 1×10¹). В то время как хранение материала в тех же условиях на стандартном тампоне в системе 1 показало хорошую высеваемость

возбудителя дифтерии в концентрациях микробной взвеси 5×10⁵ (9,43×10³ / 1,1×10⁴) и 5×10⁴ (1,45×10³ / 2,04×10³), в концентрации 5×10³ через 24 ч - 1,6×10² и через 48 ч - 2,5×10², и в концентрации 10³ через 24 ч - 3×10¹ и через 48 ч - 4×10¹.

Инкубирование в термостате при 37°C в течение 6 ч приводило к потере патологического материала как в высоких концентрациях микробной взвеси, так и в концентрации 5×10³ и практически к полной потере в концентрации 10³ при использовании двух видов тампонов в системах 1 и 2.

При хранении материала в холодильнике при 4°C в течение 6 ч на стандартном тампоне в системе 1 хорошая высеваемость возбудителя дифтерии была как в концентрации микробной взвеси 5×10³ (4,2×10² / 4,6×10²), так и в концентрации 10³ (1,1×10² / 1,4×10²), что соответствует требованиям по качеству питательных сред для первичного посева патологического материала на дифтерию. В то время как хранение материала при тех же условиях на тонком тампоне в системе 2 приводила к практически полной потере патологического материала в концентрации микробной взвеси 5×10³ (1×10¹ / 1×10¹) и в 100% случаев - в концентрации 10³ (0 / 0).

Инкубирование материала на двух видах тампонов в обоих системах в термостате при 37°C в течение 20 ч приводило к 100% потере патологического материала во всех пяти концентрациях микробной взвеси.

При хранении материала на стандартном тампоне в системе 1 в течение 20 ч при комнатной температуре приводило к потере патологического материала в концентрациях микробной взвеси 5×10⁶, 5×10⁵ и 5×10⁴, почти к полной потере в концентрации 5×10³ (0 / 6) и к 100% потере патологического материала в концентрации 10³ (0 / 0). Хранение материала на тонком тампоне в системе 2 при тех же условиях способствовало потере патологического материала в концентрации 5×10⁶, к почти полной потере в концентрациях 5×10⁵ (0 / 4×10¹), 5×10⁴ (0 / 2×10¹) и к 100% потере патологического материала в двух концентрациях - 5×10³ и 10³ (0 / 0).

Хранение патологического материала в холодильнике при 4°C в течение 20 ч показало его сохранность во всех концентрациях микробной взвеси на двух видах тампонов в обеих системах. При использовании тонкого тампона в системе 2 отмечалась хорошая высеваемость возбудителя дифтерии в концентрации 5×10⁶, сниженная - в концентрации 5×10⁵ (2,3×10³ / 2,6×10³) и 5×10⁴ (1,5×10³ / 1,57×10³), и в двух концентрациях - 5×10³ и 10³ - была потеря патологического материала. При применении стандартного тампона в системе 1 отмечалась хорошая высеваемость возбудителя во всех концентрациях - 5×10⁶, 5×10⁵, 5×10⁴ (1,36×10³ / 1,58×10³), 5×10³ (2,4×10² / 2,6×10²) и 10³ (4×10¹ / 6×10¹).

Основной задачей бактериологической диагностики дифтерийной инфекции является идентификация возбудителя с помощью минимального количества диагностических тестов, необходимых, достаточных и специфичных для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки (3-4 дня с момента обследования), что имеет еще большее значение в условиях спорадической заболеваемости. При взятии патологического материала на дифтерию двумя сухими стерильными тампонами и доставкой в бактериологическую лабораторию в течение 3 часов, выдача окончательного самого раннего бактериологического ответа будет произведена на 3 сут и самого позднего ответа - на 5 сутки.

По данным аналитических материалов по организации исследований на дифтерию, которые были проанализированы в рамках работы Референс-центра по дифтерии и коклюшу ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора для взятия патологического материала в некоторых регионах страны стали использовать коммерческие транспортные агаровые среды Стюарта и Эймса, в состав которых входят солевые буферы, что может приводить к потере патологического материала уже на преаналитическом этапе исследования. Ранее нами были проведены исследования [6], которые показали, что при помещении патологического материала в агаризованные транспортные среды Эймса и Стюарта и хранение при комнатной температуре или в холодильнике в течение 6 часов можно получить рост единичных колоний токсигенного штамма *C.diphtheriae* только в большой концентрации – 5×10^4 и полностью приводило к потере патологического материала в других концентрациях; выдерживание материала при комнатной температуре и в холодильнике в течение 20 ч приводило к полной потере патологического материала. Помещение патологического материала в коммерческие транспортные среды и подращивание в термостате в течение 6 часов не дало положительных результатов и не позволило увеличить высеваемость возбудителя дифтерии. Несколько лучшие результаты были получены при подращивании материала в этих условиях в течение 18-20 ч, когда удалось идентифицировать единичные колонии возбудителя дифтерии в концентрации 5×10^3 , но отсутствие роста в концентрации 10^3 . Т.е. было показано, что взятие патологического материала во второй половине дня и транспортировка в агаризованных средах Эймса и Стюарта приведет к потере патологического материала и, следовательно, к снижению высеваемости и выделяемости возбудителя дифтерии, что, в целом, негативно скажется на качестве проведения исследований на дифтерию. На основании этого были сформулированы положения по правилам взятия патологического материала на дифтерию в действующих СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Проведенные в настоящей работе исследования показали, что коммерческая транспортная жидкая среда Эймса (Σ -Transwab® с жидкой средой Эймса) может быть использована для взятия патологического материала на дифтерию во второй половине рабочего дня. Вместе с тем следует учитывать форму тампона, так как лучшие результаты по высеваемости возбудителя дифтерии были получены при использовании универсального тампона (тупфер с фиолетовой крышкой, система 1), в то время как при использовании урогенитального / назофарингеального тампона (тупфер с оранжевой крышкой, система 2) были получены результаты, свидетельствующие о снижении высеваемости возбудителя. По-видимому, причиной этому является то, что размер универсального тампона больше, чем урогенитального / назофарингеального.

Наилучшую высеваемость возбудителя дифтерии регистрировали при его хранении в условиях холодильника при 4°C в течение 6 или 20 ч на стандартном тампоне в системе 1 как при высоких, так и при низких концентрациях микробной взвеси. Соблюдение этих условий позволит предотвратить полную потерю патологического материала, но не приведет к его накоплению. В то время как транспортная среда, приготовленная в лабо-

раторных условиях на питательных бульонах, не только способствует сохранению патологического материала, но и к его накоплению.

Однако, применение любых транспортных сред увеличивает срок выдачи бактериологического ответа на одни сутки, тем самым самый ранний бактериологический ответ будет выдан на 4 сутки и самый поздний – на 6 сутки. Поэтому, учитывая, что токсигенные *C.diphtheriae* являются возбудителем дифтерии – воздушно-капельной инфекции, которая может привести к летальным исходам, применение транспортных сред должно быть аргументировано.

Заключение. Тампоны Σ -Transwab® с жидкой средой Эймса (тупфер с фиолетовой крышкой, система 1) могут быть рекомендованы для взятия и транспортирования патологического материала на дифтерию во второй половине рабочего дня в бактериологических лабораториях при условии хранения в холодильнике. Кроме того, применение жидкой транспортной среды позволит доставлять патологический материал из различных лечебно-профилактических организаций, в том числе удаленных территорий, в условиях централизации исследований.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 5 см. REFERENCES)

1. Максимова Н.М., Маркина С.С., Яцковский К.А., Черкасова В.В., Корженкова М.П., Сафронова А.В. и др. Дифтерия в России в 2005 - 2009 годах. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 3: 31-6.
2. Онищенко Г.Г. Эпидемиологическое благополучие населения России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2013; 1: 42-51.
3. Якимова Т.Н., Маркина С.С., Максимова Н.М. Дифтерия сегодня. *Здоровье населения и среда обитания*. 2013; 12 (249): 18-19.
4. Борисова О.Ю., Чагина И.А., Гадуа Н.Т. К вопросу о применении коммерческих транспортных сред для взятия патологического материала при обследовании на дифтерию. *Медицинский алфавит. Современная лаборатория*. 2014; 3: 21-3.

REFERENCES:

1. Maximova N.M., Markina S.S., Yatskovsky K.A., Cherkasova V.V., Korzhenkova M. P., Safronova A.V. et al. Diphtheria in Russia in 2005 - 2009. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2010; 3: 31-6. (in Russian)
2. Onishchenko G. G. Epidemiological wellbeing of the population of Russia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2013; 1: 42-51. (in Russian)
3. Yakimova T. N., Markina S.S., Maximova N.M. Diphtheria today. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2013; 12 (249): 18-9. (in Russian)
4. Centers for Disease Control and Prevention. Diphtheria. Available at: // Yellow Book 2018: health information for international travel. - New York: Oxford University Press, 2017. - Chap. 3. - URL: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/diphtheria> (accessed 03.04.2018).
5. Centers for Disease Control and Prevention. Diphtheria. Available at: Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. - 5th ed. - Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2011. - Chap. 1. - 9 p. - URL: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt01-dip.pdf> (accessed 05.01.2018).
6. Borisova O.Yu., Chagina I.A., Gadua N.T. K to a question of application of commercial transport environments for capture of pathological material at inspection on diphtheria. *Meditsinskiy alfavit. Sovremennaya laboratoriya*. 2014; 3: 21-3. (in Russian)

Поступила 23.11.18

Принята к печати 10.12.18

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.361.4-013.3:612.6.02.017.1.088

Логинова М.А.¹, Павлов А.Е.², Зайцева М.А.², Симакова Т.С.², Пильщикова Н.С.², Парамонов И.В.¹

РАЗРАБОТКА И ВЕРИФИКАЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО HLA-ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

¹ФГБУН Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России, 610027, Киров;

²ООО «ПАРСЕК ЛАБ», 197350, Санкт-Петербург

Представлены данные о разработке и верификации отечественной тест-системы для высокопроизводительного HLA-генотипирования с использованием платформы Illumina MiSeq System. Разработанная тест-система включает в себя все компоненты, необходимые для таргетного обогащения пяти генов HLA и приготовления библиотек. Учет результатов осуществляется с использованием специализированного программного обеспечения для автоматического анализа данных. Тест-система верифицирована на выборке из 93 образцов ДНК с известными HLA-генотипами. В ходе верификации определены чувствительность и специфичность тест-системы по каждому из HLA-локусов: для локусов A и B они составили 1.0 и 1.0 соответственно, для локуса C – 1.0 и 0.99, для локуса DRB1 – 0.98 и 0.99, для локуса DQB1 – 0.98 и 0.93.

Ключевые слова: HLA-типирование; тест-система; массовое параллельное секвенирование; HLA-локусы; разработка; верификация.

Для цитирования: Логинова М.А., Павлов А.Е., Зайцева М.А., Симакова Т.С., Пильщикова Н.С., Парамонов И.В. Разработка и верификация тест-системы для высокопроизводительного HLA-генотипирования потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (12): 788-792. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-788-792>

Loginova M.A.¹, Pavlov A.E.², Zaytseva M.A.², Simakova T.S.², Pilshchikova N.S.², Paramonov I.V.¹

DESIGN AND VERIFICATION OF THE REAGENT KIT FOR HIGH-PRODUCTIVE HLA-TYPING OF POTENTIAL DONORS OF HEMOPOIETIC STEM CELLS

¹FSBIS Kirov scientific-research institute of hematology and blood transfusion of FMBA of Russia, Kirov, 610027, Russian Federation;

²Parseq Lab, Saint-Petersburg, 197350, Russian Federation

The work describes the development of a reagent kit for high-performance HLA-typing using the Illumina MiSeq System platform. The developed reagent kit contains all the necessary components for target enrichment of five HLA genes, preparation of libraries, and software for automatic data analysis. The reagent kit verified on a 93 DNA samples with known genotypes. During the verification, the sensitivity and specificity of the reagent kit for each of the HLA loci were determined - for A and B they were 1.0 and 1.0, respectively, for the C-1.0 and 0.99 locus, for the DRB1 locus 0.98 and 0.99, for the DQB1 locus 0.98 and 0.93.

Key words: HLA-typing; reagent kit; massive parallel sequencing; HLA-loci; design; verification.

For citation: Loginova M.A., Pavlov A.E., Zaytseva M.A., Simakova T.S., Pilshchikova N.S., Paramonov I.V. Design and verification of the reagent kit for high-productive HLA-typing of potential donors of hemopoietic stem cells. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. (Russian Clinical Laboratory Diagnostic). 2018; 63(12): 788-792 (In Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-12-788-792>

For correspondence: Loginova M.A., PhD, head of Research Laboratory of applied immunogenetics; e-mail: mlogin2010@gmail.com

Information about authors:

Loginova M.A., <http://orcid.org/0000-0001-7088-3986>

Pavlov A.E., <http://orcid.org/0000-0002-9233-1688>

Zaytseva M.A., <http://orcid.org/0000-0002-3616-0300>

Simakova T.S., <http://orcid.org/0000-0001-9023-4852>

Pilshchikova N.S., <http://orcid.org/0000-0002-8329-3747>

Paramonov I.V., <http://orcid.org/0000-0002-7205-912X>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 22.11.2018
Accepted 01.12.2018

Введение. В последние годы молекулярно-генетические методы, основанные на технологии секвенирования нового поколения (NGS – Next Generation Sequence), находят все более широкое практическое применение [1].

Одним из важнейших направлений, где применение указанной технологии следует признать перспективным и экономически обоснованным, является массовое HLA-типирование потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), заключивших информированное согласие на вступление в российские регистры.

По состоянию на 11 октября 2018 г., число потенциальных доноров ГСК, зарегистрированных в объединенной базе данных о российских донорах BMDS (Bone Marrow Donor Search), составляет 85 181 человек, в неё включены сведения о донорах 15 локальных регистров, действующих в 11 регионах Российской Федерации [2]. Такое количество безвозмездных доноров на сегодняшний день уже обеспечило 229 трансплантаций ГСК для пациентов российских клиник [2].

В последние пять лет наметился явный прогресс во взаимодействии трансплантационных клиник с BMDS, однако многие российские пациенты по-прежнему зависят от донорского материала, получаемого из-за рубежа, либо вообще остаются без совместимого неродственного донора [3].

Сложившаяся ситуация требует увеличения числа потенциальных доноров ГСК в короткие сроки, а трансплантационные центры диктуют необходимость HLA-типирования доноров молекулярно-генетическими методами в высоком разрешении и как минимум по пяти HLA-локусам. Прогресс в расширении донорской базы ограничивается прежде всего высокой стоимостью реагентов, используемых для проведения массового HLA-типирования доноров и низкой производительностью анализа. Разработка и внедрение отечественной тест-системы с высокими технико-экономическими показателями представляется крайне актуальной задачей.

Цель работы - разработка и верификация тест-системы для высокопроизводительного HLA-типирования.

Материал и методы. Все исследования проводили с использованием базы данных HLA-аллелей - IMGT/HLA 3.28.0 (update 2017-04).

Принцип работы разработанной тест-системы основывается на таргетном обогащении 5 локусов HLA (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1, HLA-DRB1) методом ПЦР (полимеразной цепной реакции) длинных фрагментов с последующим приготовлением библиотек для секвенирования на приборах серии MiSeq™ System (Illumina Inc., США).

Праймеры на анализируемые регионы HLA были

подобраны с применением программного обеспечения Primer3Plus.

Разработка и верификация тест-системы проводилась на амплификаторах Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler и StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, США).

Верификацию тест-системы осуществляли на выборке из 93 образцов ДНК с известными генотипами, которые были предварительно исследованы по локусам HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 с использованием наборов реагентов HLAAssure SE SBT Kit (TBG Diagnostics Limited, Тайвань); для анализа данных применяли программное обеспечение AccuType™ (Texas Bio Gene Inc., Texas, США). Характеристики контрольных образцов ДНК представлены в табл. 1.

Препараты ДНК были получены методом колоночной фильтрации с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия). Концентрацию препаратов ДНК определяли на флуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США); для проведения анализа все образцы были нормализованы до концентрации 10 нг/мкл.

Показатель чувствительности тест-системы (доля совпадающих аллелей) рассчитывали как отношение числа совпадающих аллелей к общему числу аллелей.

Показатель специфичности тест-системы (доля однозначных аллелей) определяли как отношение числа аллелей с однозначно определенным генотипом к общему числу аллелей.

Результаты. Разработка. На первом этапе были определены технические требования для тест-системы - выбрана технологическая платформа, число исследуемых генетических локусов, уровень разрешения HLA-типирования, сформулированы требования к анализу данных.

В настоящее время наибольшее распространение в практике получили четыре технологии HLA-типирования: SSP (Sequence Specific Primers), SSO (Sequence Specific Oligonucleotides), SBT (Sequence Based Typing) и NGS. Метод SSP характеризуется низкой производительностью, SSO – невозможностью определения отдельных точечных вариаций, что особенно актуально при исследовании биологических образцов от доноров ГСК, относящихся к малоизученным популяциям, к которым следует отнести и большинство популяций, проживающих на территории РФ [4]. Технология SBT признана «золотым стандартом» HLA-типирования, с точки зрения идентификации новых аллелей, а при использовании современных много капиллярных секвенаторов обладает и высокой производительностью. Однако даже существенное масштабирование исследований, выполняемых методом SBT, практически не снижает стоимости типирования. При необходимости изучения дополнительных экзонов/интронов затраты на SBT-типирование возрастают. Наиболее перспективным, с точки зрения увеличения производительности и существенного снижения стоимости HLA-типирования, представляется применение технологии массового параллельного секвенирования – MPS. В качестве платформы для проведения этапа секвенирования при типировании по технологии MPS нами был выбран прибор Illumina MiSeq System (Illumina, США). Выбор в пользу указанного прибора сделан по следующим причинам:

режим парно концевое секвенирование позволяет проводить секвенирование фрагментов библиотек (до

Таблица 1
 Характеристики контрольных образцов ДНК

Локус	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQB1	HLA-DRB1
Количество уникальных образцов	92	93	93	92	84
Количество уникальных генотипов	42	79	59	47	66
Количество уникальных аллелей	18	36	20	16	29

Таблица 2

Таргетные регионы

Локус	Таргетный регион	Размер амплифицируемого участка, т.п.н
HLA-A	весь ген	~3,2
HLA-B	весь ген	~4,6
HLA-C	весь ген (кроме участка 3'-UTR)	~3,0
HLA-DQB1	1-4 экзоны	~6,1
HLA-DRB1	2-4 экзоны	~4,3

Таблица 3

Программа таргетного обогащения локусов I класса

Количество циклов	Температура	Время
1	94°C	2 мин
35	98°C	10 сек
	67°C*/60°C**/65°C***	15 сек
	68°C	3 мин*/5 мин**/5 мин***
1	68°C	10 мин
1	4°C	не ограничено

Примечание: * - для локуса HLA-A, ** - для локуса HLA-B, *** - для локуса HLA-C

Таблица 4

Программа таргетного обогащения локусов II класса

Количество циклов	Температура	Время
1	94°C	2 мин
35*/30*	98°C	10 сек
	60°C*/62°C**	15 сек*/30 сек**
	68°C	6 мин*/7 мин**
1	68°C	10 мин
1	4°C	не ограничено

Таблица 5

Характеристики наборов для секвенирования

Характеристика	Набор		
	MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов)	MiSeq Reagent Kit v2 (500 циклов)	MiSeq Reagent Kit Nano (300 циклов)
Длина прочтения	2×150 п.н.	2×250 п.н.	2×150 п.н.
Время секвенирования	24 ч	38 ч	17 ч
Число прочтений	15 млн	15 млн	1 млн
Объем данных	4,5-5,1 Gb	7,5-8,5 Gb	300 Mb
Расчетное число образцов на запуск (максимально возможное)	96	167	14

1200 п.н.), превышающих длину прочтения, что дает возможность учитывать наличие вставки при выравнивании на аллель, тем самым повышая информативность данных при работе с высоко гомологичными регионами генома;

работа с прибором достаточно проста и не требует большого количества ручных манипуляций;

наличие Регистрационного Удостоверения Минздрава РФ.

Количество типизируемых локусов и уровень разрешения были определены, исходя из потребностей рос-

сийских трансплантационных центров – потенциальных потребителей услуг донорских регистров, осуществляющих подбор доноров по пяти HLA-локусам HLA-A, -B, -C, -DQB1, -DRB1 в разрешении 4-digit.

Стандартный протокол проведения таргетного MPS исследования включает в себя следующие этапы: таргетное обогащение, приготовление библиотек, секвенирование и анализ данных.

Для таргетного обогащения целевых генов были подобраны 15 локус-специфичных праймеров: 2 на локус HLA-A, 2 – на HLA-B, 2 – на HLA-C, 4 – на HLA-DQB1, 5 – на HLA-DRB1. Для локусов II класса были выбраны вырожденные праймеры, необходимые для увеличения эффективности ПЦР в случае отжига праймера на аллельный вариант. Участки HLA-генов, покрываемые праймерами, представлены в табл. 2.

Условия реакций ПЦР длинных фрагментов были подобраны отдельно для каждого локуса. Продолжительность циклов ПЦР для HLA-локусов составила 3,0-3,8 ч. Программы амплификации для локусов I и II классов представлены в табл. 3 и 4, соответственно.

Наличие различных программ для амплификации фрагментов каждого локуса в отдельности потребовало ввести стадию пулирования полученных продуктов ПЦР перед этапом приготовления библиотек, но при этом позволило обеспечить высокую специфичность всех выбранных пар праймеров.

Этап приготовления библиотек, реализованный в разработанной тест-системе, включал в себя стадии, представленные на рисунке.

Разработка протокола исследования включала в себя выбор оптимального количества этапов, подбор и разработку реактивов, а также оптимизацию работы ферментативных смесей и условий инкубации на всех этапах протокола.

Процесс приготовления библиотек содержал 3 этапа очистки с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), с одновременной селекцией фрагментов по размеру для удовлетворения требований прохождения порогов контроля качества по размеру вставки при анализе данных.

Готовые библиотеки подвергались нормализации до концентрации 1300 нг/мкл и пулировались для получения образца для секвенирования на приборе Illumina MiSeq System.

В ходе разработки в запусках секвенирования были использованы различные наборы, представленные в табл. 5.

Из данных, представленных в таблице 5, видно, что оптимальным набором реагентов для секвенирования оказался набор MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов), позволяющий секвенировать 96 образцов одновременно. Кроме этого, указанный набор удобен для выполнения исследований в формате 96-луночного планшета, упрощает этап баркодирования образцов и минимизирует ошибки оператора.

Для реализации этапа анализа было разработано специализированное программное обеспечение (далее – ПО), работающее в автоматическом режиме и не имеющее графического интерфейса. Входными данными для ПО являются прямые и обратные прочтения в формате FASTQ, генерируемые прибором Illumina MiSeq System. Анализ данных включал следующие основные стадии: удаление последовательностей адаптеров и оснований с низким качеством на концах прочтений; выравнивание

Таблица 6

Временные затраты на производственный цикл для 96 образцов

Этап	Время работы «руками»	Общее время
Лонг-ПЦР	~5 ч	~10 ч
Пулирование локусов	~0,5 ч	~0,5 ч
Фрагментация	~0,5 ч	~0,5 ч
Очистка/size selection	~1 ч	~1 ч
Восстановление концов	~0,5 ч	~1 ч
Аденилирование	~0,5 ч	~1 ч
Лигирование адаптеров	~1 ч	~1 ч
Очистка/size selection	~1 ч	~1 ч
ПЦР с индексированием	~1 ч	~1,2 ч
Очистка/size selection	~1 ч	~1 ч
Количественная оценка	~1 ч	~1 ч
Секвенирование	-	~24 ч
Анализ данных	-	~6 ч
Σ	~13 ч	~50 ч

Таблица 7

Показатели чувствительности и специфичности разработанной тест-системы

Локус	Чувствительность	Специфичность
HLA-A	1,00	1,00
HLA-B	1,00	1,00
HLA-C	1,00	0,99
HLA-DQB1	0,98	0,93
HLA-DRB1	0,98	0,99

Таблица 8

Расхождения данных HLA-типирования, полученные при использовании разработанной тест-системы

№ п/п	№ образца	Контрольные данные	Экспериментальные данные
1	2646	HLA-C*12:02; 12:03	HLA-C*04:09N; 12:02
2	2610	HLA-DQB1*02:02, 02:02	HLA-DQB1*02:02, 02:80
3	2655	HLA-DQB1*02:01, 02:02	HLA-DQB1*02:01, 02:80
4	2753	HLA-DQB1*02:01, 03:01	HLA-DQB1*02:01, 02:59
5	2754	HLA-DQB1*03:01, 05:01	HLA-DQB1*05:01, 05:01
6	2755	HLA-DQB1*03:02, 03:03	HLA-DQB1*02:59, 03:02
7	2759	HLA-DQB1*03:01, 03:01	HLA-DQB1*03:01, 03:04
8	2661	HLA-DRB1*07:01, 07:01	HLA-DRB1*07:01, 07:47
9	2647	HLA-DRB1*04:02, 10:01	HLA-DRB1*10:01, 10:01
10	2752	HLA-DRB1*01:01, 04:08	HLA-DRB1*01:01, 01:01

прочтений на последовательности базы данных IMGT/HLA Database с использованием двух независимых алгоритмов; оценка качества; присвоение наиболее вероятного HLA-генотипа; автоматический экспорт результатов в клинический отчет в текстовом и машиночитаемом форматах, совместимых с базой данных регистра.

В разработанном ПО реализованы три независимых алгоритма анализа данных:

выравнивание на кодирующие последовательности базы данных (используются только прочтения с экзонав);

выравнивание на последовательности полных геномов базы данных (используются прочтения с экзонов и интронов);

сравнение генотипов, определенных алгоритмами 1 и 2, и определение более вероятного генотипа в случае выявления расхождений.

ПО обеспечивало выполнение оценки качества данных запуска по среднему количеству прочтений, выровненных на локус; по среднему числу прочтений, выравниваемых на несколько локусов; по среднему значению размера вставки и по среднему покрытию экзонов по локусу. Оценка качества образца предусмотрена по количеству прочтений, выровненных на локус; по дисбалансу по покрытию ключевых экзонов; по размеру вставки и дисбалансу по покрытию остальных экзонов.

Результаты хронометрии производственного цикла по HLA-типированию 96 образцов с использованием разработанной тест-системы представлены в табл. 6.

Верификация. Результаты оценки аналитических характеристик разработанной тест-системы представлены в табл. 7.

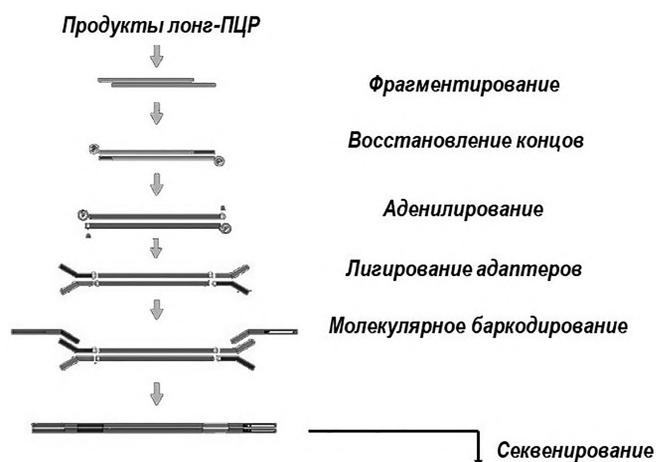
Наибольшая чувствительность тест-системы достигалась при использовании в ПО алгоритма 3. Расхождения между контрольными и экспериментальными данными, выявленные при применении разработанной тест-системы, представлены в табл. 8.

Установлено, что ошибки генотипирования в образцах с №1 по №8 (табл. 8) были связаны с присвоением образцу наиболее вероятного генотипа при расхождении результатов, полученных с помощью алгоритмов 1 и 2. Указанная проблема была решена путем добавления в алгоритм 3 значения «достоверный генотип не определен» и введения критериев его присвоения, с последующей повторной верификацией алгоритма 3.

Для двух образцов по локусам HLA-DRB1 (таблица 8 - №9 и №10) не были идентифицированы аллели HLA-DRB1*04:02 и HLA-DRB1*04:08. Это было обусловлено тем, что для образцов, гетерозиготных по аллелям группы DRB1*04, характерен аллельный дисбаланс, вызванный неравномерностью амплификации: размер ПЦР продукта для аллелей группы DRB1*04 составляет 5,5 т.п.н, в то время как, для других аллельных групп – 4,3 т.п.н. Для увеличения чувствительности тест-системы в отношении аллелей группы DRB1*04 требуется дальнейшая оптимизация условий проведения ПЦР длинных фрагментов.

Оптимальный по чувствительности алгоритм 3 дал следующие результаты по неоднозначности: по локусу А и В все аллели были идентифицированы однозначно, по локусу С – 184 аллеля из 186, по локусу DQB1 – 175 аллелей из 184, по локусу DRB1 – 167 аллелей из 168. По локусу HLA-C выявленные неоднозначности содержали редкие аллели, которые не были включены в алгоритм выравнивания на экзоны (алгоритм 1), поэтому вместо них ПО выдало наиболее близкие распространенные аллели, и соответственно алгоритм 3 выдал результат «редкий аллель/распространенный аллель». По локусу HLA-DRB1 полученная неоднозначность была связана с неполным покрытием гена. По локусу HLA-DQB1 все неоднозначности относились к образцам, гетерозиготным по одной аллельной группе, когда аллели имели идентичные последовательности второго и третьего экзонов, а последовательность интрона 2 была больше размера вставки и близка для части аллелей, формирующих неоднозначность, для некоторых – неизвестна совсем.

В целом результаты верификации позволили сделать заключение о том, что доля неоднозначных аллелей, выявленных при использовании разработанной тест-системы, незначительна и является приемлемой.



Стадии этапа приготовления библиотек.

Обсуждение. В ходе проведенных исследований разработана тест-система для массового генотипирования по локусам HLA-A, -B, -C, -DQB1, -DRB1 в разрешении 4-digit в формате 96 тестов с полным производственным циклом 50 ч., или 2,5 рабочих дня. По расчетным данным при условии применения одного прибора Illumina MiSeq System разработанная тест-система обеспечивает выполнение генотипирования 10 000 образцов по 5 HLA-локусам в высоком разрешении в год силами 2-3 человек.

Разработанная тест-система представляет собой набор из четырех комплектов реагентов: комплект для таргетного обогащения генов HLA (1), комплект для приготовления библиотек (2), комплекты баркодов для двойного баркодирования (3 и 4). Такое разделение компонентов тест-системы позволяет хранить первый комплект в зоне пре-ПЦР, остальные – в зоне пост-ПЦР. Это может рассматриваться как дополнительная пассивная защита технологии от возможной кросс-контаминации образцов, риск которой при потоковых исследованиях принято считать очень высоким.

Уровни чувствительности и специфичности, обеспечиваемые при использовании разработанной тест-системы, сопоставимы с таковыми, декларированными для доступных в настоящее время коммерческих тест-систем зарубежного производства (AllType NGS, HoloType HLA, NGSgo)

В целом полученные результаты позволяют сделать заключение о возможности использования разработанной тест-системы для массового типирования потенциальных доноров ГСК.

Выводы.

1. Разработана тест-система для проведения высокопроизводительного HLA-типирования локусов HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 с разрешением 4-digit на базе платформы Illumina MiSeq System.

2. Тест-система верифицирована на выборке из 93 образцов; установленные аналитические характеристики являются приемлемыми для HLA-генотипирования доноров ГСК.

3. Использование двух независимых алгоритмов позволяет в автоматическом режиме получать достоверные HLA-генотипы по всем исследуемым локусам, что имеет значение при большом потоке образцов, поскольку не требует длительной и трудоемкой процедуры оценки качества данных высококвалифицированным специалистом.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование. Москва: БИНОМ Лаборатория знаний; 2014.
2. Счетчик регистра (2018). Доступен: http://www.rdkm.rusfond.ru/registr_stat/001 (обновление 11.10.2018).
3. Макаренко О.А., Алянский А.Л., Иванова Н.Е. и др. Эффективность поиска неродственного донора гемопоэтических стволовых клеток с помощью российской поисковой системы Bone Marrow Donor Search: опыт НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой. *Клиническая онкогематология*. 2017; 10: 39-44.
4. Логинова М.А., Парамонов И.В. Новые HLA-аллели в российских популяциях. *Трансфузиология*. 2016; 3(17): 13-20.

REFERENCES

1. Rebrikov D.V., Korostin D.O., Shubina E.S., Il'inskij V.V. NGS: high throughput sequencing. Moscow: BINOM Laboratoriya znanij; 2014. – 232. (in Russian)
2. The counter register (2018). Available at: http://www.rdkm.rusfond.ru/registr_stat/001 (update 11.10.2018). (in Russian)
3. Makarenko O.A., Alyanskij A.L., Ivanova N.E. et al. The effectiveness of the search for an unrelated hematopoietic stem cell donor using the Russian search system Bone Marrow Donor Search: the experience of the Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantology named after R.M. Gorbacheva. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2017; 10: 39-44. (in Russian)
4. Loginova M.A., Paramonov I.V. New HLA alleles in Russian populations. *Transfuziologiya*. 2016; 3(17): 13-20. (in Russian)

Поступила 22.11.18

Принята к печати 01.12.18

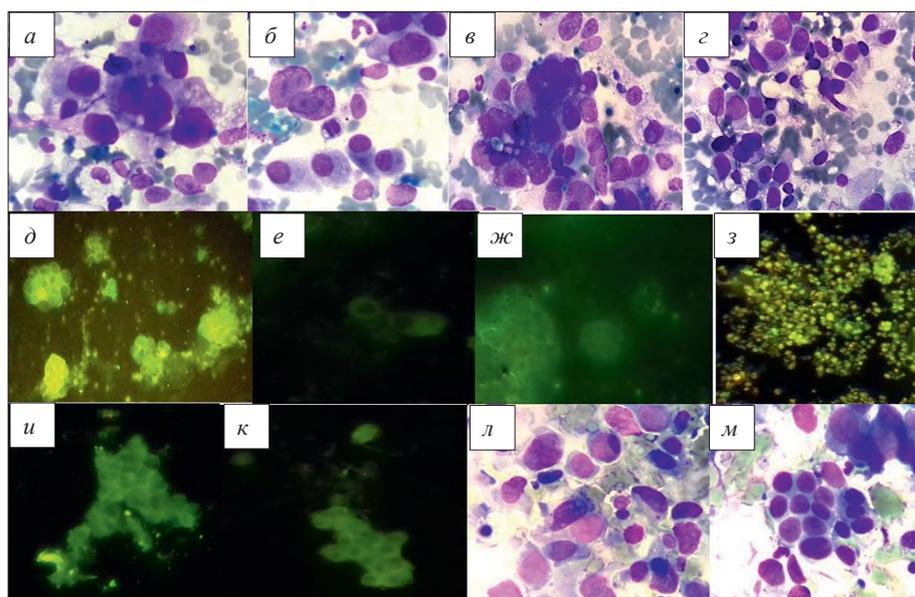


Рис.2. Асцитическая жидкость (клинический случай 1)

a-d – псевдопапиллярные скопления опухолевых клеток с увеличенными ядрами и грубозернистым хроматином, среди которых единичные мезотелиальные клетки (стрелка); *д-к* – ФИЦХИ в ячейках биочипа. Флуоресценция клеточных мембран (положительная мембранная реакция) с антителами к СА125 и BerEp4 (*д, ж*), флуоресценция цитоплазмы опухолевых клеток при негативном окрашивании ядра (положительная цитоплазматическая реакция) с антителами к CK7 (*е*). В части клеток отмечается флуоресценция в области ядра при негативном или аутоокрашивании цитоплазмы (положительная ядерная реакция) с антителами к рецепторам эстрогенов (*з*). Затемнение в области ядра клеток (отрицательные ядерные реакции) с антителами к TTF-1, CDX2 (*и, к*). *л, м*: скопления и отдельно лежащие опухолевые клетки в ячейках биочипа после проведения ФИЦХИ. *a-г, л, м* – окрашивание по Романовскому. Ув 1000; *д-к* – окрашивание флуорохром AlexaFluor488. Ув. 200.

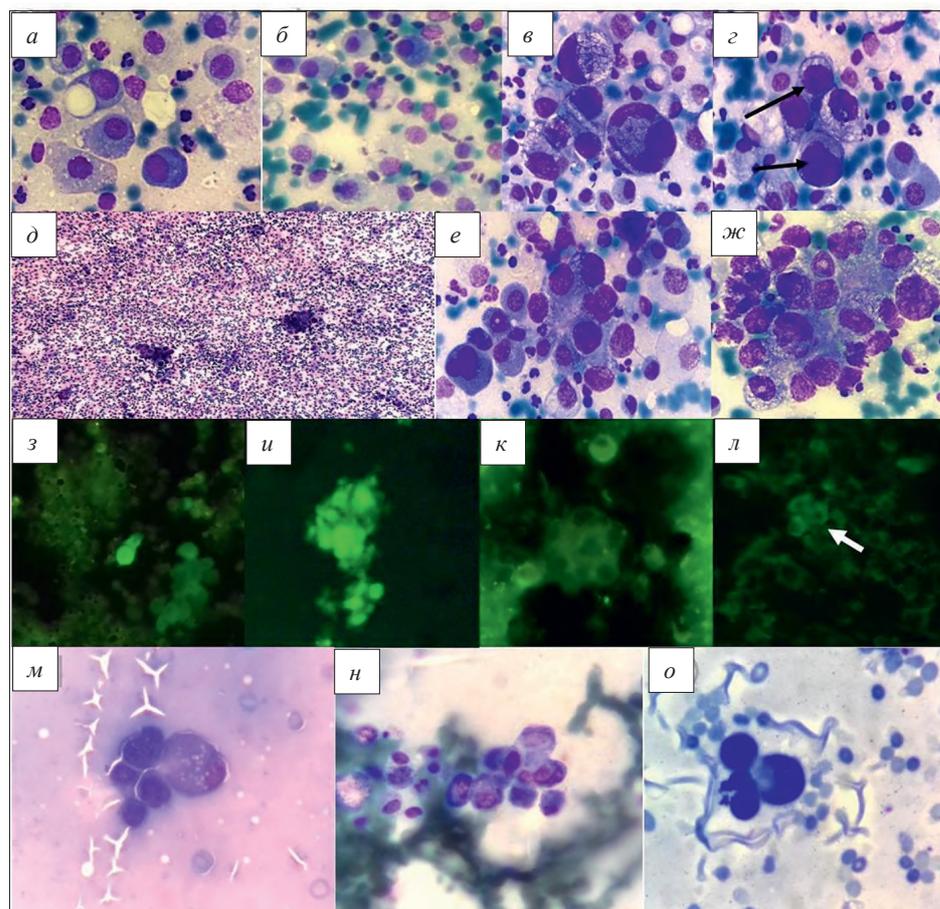


Рис.3. Плевральная жидкость: диссеминация опухолевых клеток по плевре (клинический случай 2).

a, б, – мезотелиальные клетки; *в-ж* – комплексы опухолевых клеток. Граница скоплений чёткая, клеточный и ядерный полиморфизм резко выражен, отмечаются гипертрофированные ядрышки (стрелки); *з-л*: ФИЦХИ в ячейках биочипа. Положительная цитоплазматическая реакция с антителами к CK7 (*з, л*); ядерная реакция с антителами к TTF-1 (*и*); мембранная реакция с антителами к BerEp4 (*к*) *м-о* – комплексы клеток и отдельно лежащие опухолевые клетки в ячейках биочипа после проведения ФИЦХИ. *a-ж, м-о* – окрашивание по Романовскому. УВ. 1000. *д* – ув.100. *з, л* – окрашивание флуорохром AlexaFluor488. Ув. 200.

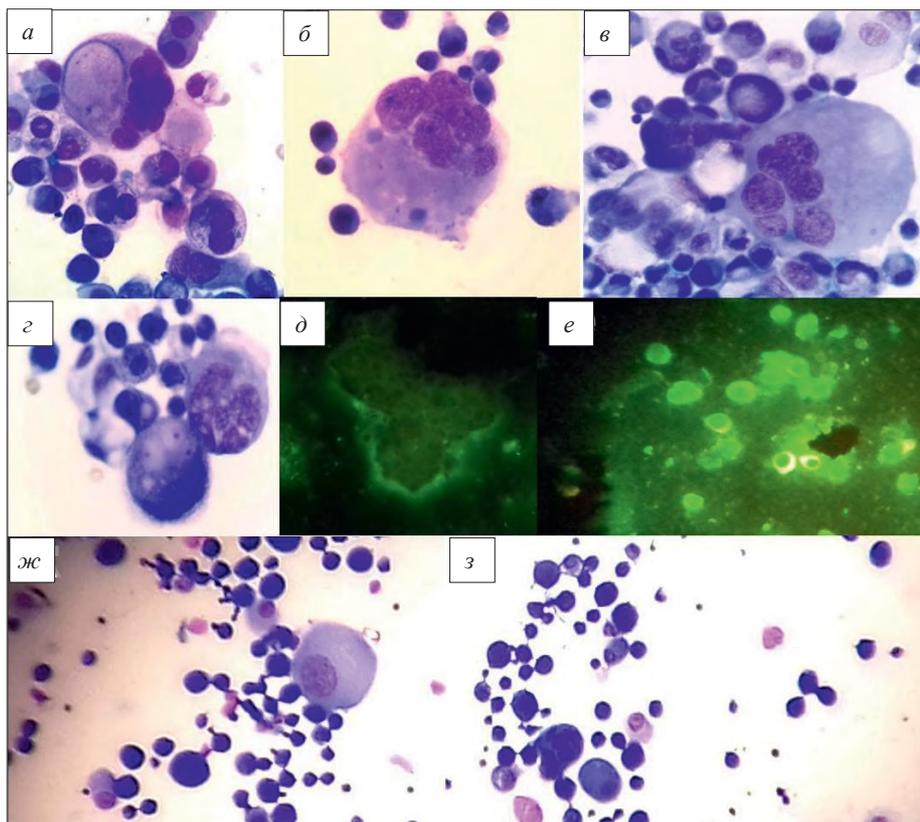


Рис.4. Асцитическая жидкость (клинический случай 3).

a-z – мелкие псевдопапиллярные скопления (*в*) и разрозненно лежащие клетки с признаками полиморфизма, в том числе поликарियोны; *д-е* – ФИЦХИ в ячейках биочипа. Отрицательные реакции с антителами к VегЕr4 (*д*) и CDX2 (*е*); *жс-з* – клеточный состав в ячейках биочипа после проведения ФИЦХ.

a-z, жс, з – окрашивание по Романовскому. Ув. 1000. *д-е* – окрашивание флуорохромом AlexaFluor488. Ув. 200.