

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 64

2 • 2019

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

ФЕВРАЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

Телефон редакции:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л. А. Шанкина

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. 8-903-724-40-29

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

Художественный редактор

Е.М. Архипова

Сдано в набор 17.01.2019.

Подписано в печать 30.01.2019.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

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. Клини. лаб. диагностика.
2019. № 2. 65–128.

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"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 64
2 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

FEBRUARY

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*

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. REZNIKOVA (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKIY (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Иванов Г.А., Антонов А.М. Лауриновая жирная кислота, среднепечочные триглицериды, позитивное действие при синдроме резистентности к инсулину, дегенеративной патологии нейронов, атеросклерозе и атероматозе 68

ЦИТОЛОГИЯ

- Банковская Л.А., Щёкотова А. П., Малютин Н. Н. Количественные и качественные параметры риноцитогаммы при воздействии метанола и формальдегида в условиях производства 78

КОАГУЛОЛОГИЯ

- Потылицина В.В., Самоиленко В.В., Лобанова С.М., Ольховский И.А., Пальгова И.В. К вопросу использования методов фактор-параллелизма и индекса циркулирующего антикоагулянта в алгоритме диагностики дефицита факторов свертывания 83

ИММУНОЛОГИЯ

- Смирнова А.В., Борзова Н.Ю., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И., Бойко Е.Л. Метод прогнозирования перинатальных гипоксических поражений центральной нервной системы у новорожденных 89
- Новиков Ю.А., Охлопков В.А., Индутный А. В., Кравченко Е.Н., Интерлейкины - 23, -12p40 как маркеры повреждения нервной ткани при нейросифилисе 94
- Чуров А.В., Новицкая А.В., Коломейчук С.Н., Олейник Е.К. Показатели клеточного иммунитета при ревматоидном артрите: роль цитомегаловирусной инфекции 98

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Димитрова Н.И., Гасретова Т.Д., Алутина Э.Л., Харсеева Г.Г. Чувствительность и резистентность к антимикробным препаратам БЛРС-продуцирующих и не продуцирующих БЛРС штаммов E.coli у больных с инфекцией мочевыводящих путей 104
- Годовалов А.П., Даниелян Т.Ю., Карпунина Т.И. Характеристики штаммов лактобактерий, обладающие диагностической значимостью в гинекологической практике 111
- Оганесян А. Н., Воропаева Е. А., Мельникова А. А., Миронов А.Ю., Егорова Е. А., Урбан Ю. Н., Гречишников О. Г., Метельская В. А., Воропаев А. Д. Эффективность методов лабораторной диагностики гнойного бактериального менингита 117
- Кецко Ю. Л., Лунина А. В., Гусякова О. А., Петровская Е. В., Лямин А. В., Козлов А. В., Новокщёнов С. Г. Показатели основного обмена при воспалительном синдроме бактериального генеза: предикторы прогноза или необходимость своевременной коррекции? 122

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Ivanov G.A., Antonov A.M. Laurine fatty acids, medium fatty acids and triglycerides, hyperlipidemia, resistance to insulin, prevention of atherosclerosis and atheromatosis

CYTOLOGY

- Bankovskaya L.A., Shchekotova A.P., Malyutina N.N. The quantitative and qualitative parameters of rhythytocograms in methanol and formaldehyde impact in production environment

COAGULOGY

- Potylytsina V.V., Samoilenko V.V., Lobanova S.M., Olkhovskiy I.A., Palgova I.V. The issue of use parallelism factor method and index of circulating anticoagulant in diagnostic algorithm deficiency of coagulation factors

IMMUNOLOGY

- Smirnova A.V., Borzova N.Yu., Sotnikova N.Yu., Malyshkina A.I., Bojko E.L. Method for predicting perinatal hypoxic lesions of the central nervous system in newborns
- Novikov Yu.A., Ochlopkov V.A., Indutny A.V., Kravchenko E.N. Interleukins - 23, -12p40 as markers of neural tissue damage in neurosyphilis
- Churov A.V., Novitskaya A.V., Kolomeichuk S.N., Oleinik E.K. Indices of cell-mediated immunity in rheumatoid arthritis: the role of cytomegalovirus infection

MICROBIOLOGY

- Dimitrova N.I., Gasretova T.D., Alutina E.L., Kharseeva G.G. Sensitivity and resistance to antimicrobial agents ESBL-producing and not producing ESBL strains of E. coli in patients with urinary tract infection
- Godovalov A.P., Danielyan T.Yu., Karpunina T.I. Characteristics of lactobacteria strains, having diagnostic significance in gynecological practice
- Oganesyanyan A.N., Voropaeva E.A., Mel'nikova A.A., Mironov A.Yu., Egorova E.A., Urban Yu.N., Grechishnikova O.G., Metel'skaya V.A., Voropaev A.D. Efficacy of laboratory methods of diagnostic of purulent bacterial meningitis
- Ketsko Yu. L., Lunina A. V., Gusyakova O. A., Petrovskaya E. V., Lyamin A. V., Kozlov A. V., Novokshchenov S. G. The indicators of basal metabolism in inflammatory syndrome bacterial origin: predictors of prognosis or the need for timely correction?

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Титов В.Н.¹, Иванов Г.А.², Антонов А.М.³

ЛАУРИНОВАЯ ЖИРНАЯ КИСЛОТА, СРЕДНЕЦЕПОЧЕЧНЫЕ ТРИГЛИЦЕРИДЫ, ПОЗИТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРИ СИНДРОМЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНСУЛИНУ, ДЕГЕНЕРАТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ НЕЙРОНОВ, АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И АТЕРОМАТОЗЕ

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

²ООО «Биолаборатория», территория инновационного центра «Сколково», Москва;

³ФГАОУ ВО «Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова», Архангельск

И хотя в полной мере биохимия позитивного действия среднецепочечных жирных кислот (ЖК) и одноименных триглицеридов in vivo не до конца понята, пища, обогащенная среднецепочечными ЖК и одноименными ТГ эффективна у пациентов с диабетом первого типа, синдроме резистентности к инсулину и при нейродегенеративной патологии. Лауриновая C12 ЖК составляет половину ЖК в кокосовом масле. Жители юго-востока Азии при постоянном использовании в пищу кокосового масла, имеют в популяции низкий уровень заболеваний сердечнососудистой системы. При регуляторном приеме с пищей C12:0 лауриновой ЖК формируется состояние умеренного кетоза и нейропротективное действие. В отличие от длинноцепочечных ЖК, клетки не депонируют среднецепочечные ТГ ни в висцеральных жировых клетках сальника, ни в инсулинзависимых адипоцитах. Среднецепочечные ЖК быстро окисляют митохондрии; образование ацетил-КоА клетки используют для образования кетонных тел, активируя термогенез в оранжевых и бурых адипоцитах. Эксперименты с животными и наблюдения в клинике показали - прием с пищей среднецепочечных ТГ более физиологичен, чем длинноцепочечных масел. Это достоверно повышает уровень холестерина в липопротеинах высокой плотности. Пища, обогащенная среднецепочечными ТГ является оптимальной для повышения содержания кетонов в плазме крови, спинно-мозговой жидкости, не ограничивая содержание углеводов в пище. Формирование избытка кетонных тел клетками можно достигнуть за счет активации метаболических превращений среднецепочечных ЖК, без голодания и сохранения в пище углеводов. Кокосовое масло оказывает позитивное воздействие на сердечно-сосудистую систему, предотвращая формирование атеросклероза и атероматоза. Эффективным в профилактике патологии сердечно-сосудистой системы является снижение в пище количества пальмитиновой ЖК, увеличение олеиновой ЖК, полиеновых ЖК при одновременном увеличении доли среднецепочечных ЖК.

Ключевые слова: лауриновая; каприловая, каприновая жирные кислоты; среднецепочечные триглицериды; инсулин.

Для цитирования: Титов В.Н., Иванов Г.А., Антонов А.М. Лауриновая жирная кислота, среднецепочечные триглицериды, позитивное действие при синдроме резистентности к инсулину, дегенеративной патологии нейронов, атеросклерозе и атероматозе. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64(2): 68-77. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-68-77>

Titov V.N.¹, Ivanov G.A.², Antonov A.M.³

LAURINE FATTY ACIDS, MEDIUM FATTY ACIDS AND TRIGLYCERIDES, HYPERLIPIDEMIA, RESISTANCE TO INSULIN, PREVENTION OF ATHEROSCLEROSIS AND ATEROMATOSIS

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

²ООО «Биолаборатория», Moscow, territory of the innovation center «Skolkovo»;

³FGAOU VO "Northern (Arctic) Federal University. M.V. Lomonosov", Arkhangelsk

Although the biochemistry of the positive effects of medium-chain fatty acids (FA) and triglycerides (TG) of the same name in vivo is not fully understood, food enriched with medium-chain LC and the same TG is effective in patients with type I diabetes, insulin resistance syndrome and in neurodegenerative pathology. Lauric C12 LC is half the FA in coconut oil. Residents of southeast Asia with constant use of coconut oil, have a low level of diseases of the cardiovascular system in the population. With a regulatory intake with food C12:0 laurin FA formed moderate ketosis and neuroprotective effect. Unlike long-chain LC, medium-chain TG cells are not deposited either in visceral fat cells, or in insulin-dependent adipocytes. Medium-chain fatty acids rapidly oxidize mitochondria; the formation of acetyl-CoA cells is used to form ketone bodies, activating thermogenesis in orange and brown adipocytes. Experiments with animals and observations in the clinic showed that taking medium-chain TG with food is more physiological than long-chain oils. This significantly increases the level of cholesterol in high-density lipoproteins. Food enriched with medium chain TG is optimal for increasing the ketone content in blood plasma, cerebrospinal fluid without limiting the carbohydrate content in food. The formation of excess ketone bodies by cells can be achieved by activating the metabolic transformations of medium-chain FAs, without fasting and preserving carbohydrates in food. Coconut oil has a positive effect on the cardiovascular system, preventing the formation of atherosclerosis and atheromatosis. Effective in the prevention of the pathology of the cardiovascular system is a decrease in food amounts of palmitic acid, an increase in oleic acid, polyene FA with a simultaneous increase in the proportion of medium-chain FA.

Key words: lauric; caprylic; capric fatty acids; medium chain triglycerides; insulin

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

For citation: Titov V.N., Ivanov G.A., Antonov A.M. Laurine fatty acids, medium fatty acids and triglycerides, hyperlipidemia, resistance to insulin, prevention of atherosclerosis and atheromatosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64 (2): 68-77 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-68-77>

Acknowledgment. This study had no sponsorship.

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

Received 14.12.2018
Accepted 25.12.2018

Согласно представлениям специалистов, сложившимся пятьдесят лет назад, сахарный диабет является патологическим процессом, основу патогенеза которого составляют нарушения структуры клеток. Ни при одном виде лечения, структурные нарушения при сахарном диабете устранить не удастся; нарушения структуры и функции клеток можно только компенсировать путем оптимальной заместительной терапии. Сахарный диабет – заболевание с «фатальным оттенком»; особенности патогенеза приобретенных и врожденных нарушений дают возможность дифференцировать диабет первого и второго типа.

Сахарный диабет и синдром резистентности к инсулину. Согласно нашим представлениям, сахарный диабет первого типа формируется, когда β -клетки островков Лангерганса поджелудочной железы, в условиях чаще экзогенной аутоиммунной агрессии и последующей деструкции, утрачивают способность синтезировать, запасать и секретировать инсулин при реализации биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии (внешнего питания). В плазме крови при этом инсулин не циркулирует, нет и С-пептида. Современная, оптимальная заместительная терапия, потребность в которой возникает порой в первые месяцы жизни новорожденного, может полностью компенсировать отсутствие синтеза гуморального медиатора, гормона инсулина. Сахарный диабет первого типа является инсулиндефицитным; наиболее часто инициирует его вирусная инфекция, в частности, краснуха.

Диабет второго типа - это врожденное нарушение структуры во всех зависимых от инсулина клетках, когда при связывании инсулина со специфичным рецептором на плазматической мембране клеток, при нарушении каскадной передачи, сигнал гуморального медиатора не может достигнуть специфичных органелл, которые функционально выставляют на плазматическую мембрану клеток дополнительное число активируемых инсулином глюкозных транспортеров-4 – ГЛЮТ-4. И если в цитоплазме клеток при этом формируется выраженная гипогликемия, то во внеклеточной среде и во внутрисосудистом русле постоянно сохраняется состояние гипергликемии. При этом низкое содержание глюкозы в цитоплазме клеток, гуморальным путем активирует синтез и секрецию инсулина в межклеточную среду, формируя в плазме крови не только гипергликемию, но гиперинсулинемию. Со временем, длительная гиперфункция β -клеток поджелудочной железы приводит к их истощению; при этом диабет второго типа становится идентичным сахарному диабету первого

типа. Все патогенетические механизмы диабета второго типа формируются в онтогенезе особи; этиологические же факторы синдрома резистентности к инсулину (синдрома ИР) сформировались на разных ступенях длительного филогенеза.

В отличие от структурно обусловленных форм сахарного диабета первого и второго типа, синдром резистентности к инсулину является нарушением только функциональным. При хорошем взаимопонимании эндокринолога и пациента, при упорном желании второго быть здоровым, большинство случаев синдрома ИР можно нормализовать. Все семь этиологических факторов синдрома ИР с интервалами в тысячи лет, которые мы выделили, сформировались на ступенях филогенеза и в онтогенезе спровоцированы афизиологичным воздействием факторов внешней среды.

Первым, сформированным на ступенях филогенеза миллионы лет ранее этиологическим фактором синдрома ИР, является функциональное состояние, согласно которому клетки из внеклеточной среды не будут поглощать глюкозу, пока есть возможность поглощать ЖК в форме полярных неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) из ассоциатов с липидпереносящим белком альбумином. Основным фактором, который блокирует поглощение клетками глюкозы, является повышенное содержание в межклеточной среде, в плазме крови ЖК в форме НЭЖК [1]. Инсулин активирует поглощение клетками глюкозы в два этапа:

а) вначале гормон блокирует липолиз в инсулин-зависимых подкожных адипоцитах (ИПА), но не в висцеральных жировых клетках (ВЖК) сальника, понижая в плазме крови содержание НЭЖК;

б) далее инсулин инициирует выставление на мембрану зависимых клеток дополнительное число глюкозных транспортеров ГЛЮТ4, активируя поглощение клетками глюкозы.

Ранние в филогенезе жирные кислоты и поздний на ступенях филогенеза гуморальный медиатор инсулин. С позиций общей биологии, ЖК мы подразделяем на насыщенные (НЖК), двойных связей (ДС) в цепи атомов углерода (-C=C-) не имеют. В моносaturированных ЖК (МЖК) имеется одна ДС в цепи атомов углерода при длине C16 и более. Ненасыщенные ЖК (ННЖК) содержат две, три ДС по длине атомов углерода C18; полиеновые ЖК (ПНЖК) содержат 4, 5 и 6 ДС, они являются эссенциальными, это C20 и C22 ЖК рыбьего жира. Биологический вид *Homo sapiens* (Человек разумный) синтезировать их практически не может.

Инсулин активирует поглощение клетками глю-

козы, главным образом, с целью синтезировать из нее последовательно С16:0 пальмитиновую НЖК, далее С18:0 стеариновую НЖК и, наконец, ω-9 С18:1 цис-олеиновую МЖК. Биологическая роль инсулином стимулированного превращения пальмитиновой НЖК в олеиновую МЖК определено выраженным различием физико-химических параметров двух ЖК. Озон в экспериментах *in vitro* и в матриксе митохондрий *in vivo* окисляет олеиновую МЖК с константой скорости реакции в пять раз более высокой, по сравнению с пальмитиновой НЖК [2].

Наиболее часто становление синдрома ИР инициирует избыточное поедание мясной пищи, высокое содержание в ней пальмитиновой НЖК [3]. Различие состоит в том, что при избыточном количестве мясной (плотоядной) пищи и экзогенной пальмитиновой НЖК, гепатоциты травоядного в филогенезе вида *Homo sapiens* синтезируют, главным образом, пальмитиновые позиционные формы ТГ как олеилпальмитоил-олеат (ОПО) глицерол, пальмитоилпальмитоил-олеат (ППО), олеилпальмитоил-олеат (ОПП) и пальмитоилпальмитоилпальмитат (ППП) глицерол. При физиологично высоком содержании в пище углеводов и физиологичной функции β-клеток, гепатоциты синтезируют из глюкозы олеиновые позиционные формы ТГ как олеил-олеил-олеат (ООО) глицерол, пальмитоил-олеил-олеат (ПОО), олеил-олеитпальмитат (ООП) и пальмитоил-олеилпальмитат (ПОП) [4]. Позиционные формы ТГ определяют при использовании газовой хроматографии с пламенно ионизационным детектором и дополнительном определении специфичных факторов коррекции [5].

Пальмитиновые позиционные формы ТГ (ОПО – ППО – ОПП – ППП) являются, с индивидуальными различиями, оптимальным субстратом для гидролиза только печеночной глицеролгидролазой и ее кофактором апоС-III в составе липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) → липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Клетки поглощают пальмитиновые ЛПНП путем апоВ-100 рецепторного эндоцитоза. Олеиновые позиционные формы ТГ (ООО – ПОО – ООП – ПОП) являются оптимальным субстратом для гидролиза их при действии постгепариновой липопротеинлипазы и ее кофактора апоС-II; происходит это в составе только ЛПОНП; в процессе липолиза олеиновые ЛПОНП в ЛПНП не превращаются. Все лигандные олеиновые ЛПОНП поглощают клетки путем инсулинзависимого апоЕ/В-100 рецепторного эндоцитоза. Нормализация биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии (внешнего питания) и увеличение в пище содержания среднецепочечных ЖК (С8-С12) и одноименных ТГ при синдроме ИР рассматривают как явно эффективное. Клинические наблюдения показали, что повышение содержания в пище среднецепочечных триглицеридов (СЦТГ) снижает в плазме крови содержание ТГ, уменьшает индекс массы тела как в экспериментах на животных, так и в наблюдениях в клинике [6]. Хотя в полной мере механизмы позитивного действия СЦТГ не до конца поняты, пища обогащенная среднецепочечными ЖК и одноименными ТГ

оказывается эффективной у пациентов с диабетом первого типа и при синдроме ИР.

Лауриновая среднецепочечная жирная кислота кокосового, растительного

масла. В последние годы СЦТГ кокосового масла, в котором порой доминирует С12 лауриновая НЖК, официально рекомендована для использования в качестве растительного масла для салатов и приготовления пищи [7]. В отличие от длинноцепочечных ЖК, которые доминируют в большинстве растительных масел, среднецепочечные ТГ клетки не депонируют. Не сохраняют их ни ранние в филогенезе ВЖК сальника, ни более поздние на ступенях филогенеза ИПА жировой клетчатки. СЦТГ не способствуют образованию «эктопического жира», который может формировать синдром ИР и активировать биологическую реакцию воспаления, гуморально активируя при этом функцию оседлых (резидентных) иммунокомпетентных макрофагов. После всасывания среднецепочечные ЖК быстро окисляют митохондрии клеток; образованное при этом количество ацетил-КоА клетки используют для образования кетоновых тел, активируя одновременно и термогенез в составе оранжевых и бурых адипоцитов. Эксперименты с лабораторными животными и клинические наблюдения свидетельствуют, что прием с пищей СЦТГ более физиологичен, чем прием длинноцепочечных растительных масел. И хотя СЦТГ способствуют повышению уровня спирта холестерина (ХС) в плазме крови; однако они более выражено увеличивают содержание ХС в липопротеинах высокой плотности (ХС-ЛПВП), чем в липопротеинах низкой плотности (ХС-ЛПНП).

Лауриновая С12 ЖК составляет около половины всех ЖК в кокосовом масле. Жители юго-востока Азиатского континента, которые постоянно используют в пищу кокосовое масло, имеют в популяции низкий уровень заболеваний сердечно-сосудистой системы. Поскольку СЦТГ при регулярном приеме формируют умеренный кетоз, им свойственно позитивное нейропротективное действие [8]. По сравнению со среднецепочечными ЖК С8-С10, обогащенные С12 лауриновой ЖК растительные масла:

а) пригодны для приготовления пищи при умеренной температуре;

б) менее выражено, но более длительно повышают в крови содержание кетоновых тел. Определено это тем, что гепатоциты с меньшей константой скорости реакции окисляют С12 лауриновую ЖК, в сравнении с более короткими С8 каприновой и С10 каприловой ЖК.

ЖК средней длины С8-С12 являются более водорастворимыми, чем жирные кислоты с длинной цепью С16-С22. В водной, гидрофильной фазе содержимого кишечника они не формируют мицелл; это обеспечивает быстрое всасывание их энтероцитами тонкого кишечника без образования мицелл. Среднецепочечные ЖК являются слабыми электролитами; они как правило выражено ионизированы при нейтральном значении pH; это еще в большей мере способствует увеличению их растворимости. Заметное различие в растворимости происходит при длине цепей С10 и менее и не относится к лауриновой кислоте. СЦТГ не

подвержены депонированию ни в независимых от инсулина ВЖК сальника, ни в инсулинзависимых ИПА жировой клетчатки. СЦТГ имеют общее число атомов углерода в молекуле от С24 - С30; только несколько % ТГ в составе кокосового масла имеют такую длину. Позиционные формы ТГ с лауриновой С12 ЖК имеют большее число атомов углерода и метаболизируют их клетки несколько иначе, чем СЦТГ с меньшим числом атомов углерода и более низкой мол. массой, которые содержат только С8 - С10 ЖК. Более низкая мол. масса ТГ со средней длиной цепи ЖК способствует более активному действию панкреатической липазы. Эти липазы гидролизуют среднецепочечные ТГ быстрее и более полно, чем длинноцепочечные ТГ. Эпидемиологические данные полученные в популяциях, которые потребляют значительное количество кокосового масла, часто приводят в качестве доказательства того, что кокосовое масло оказывает позитивное воздействие на сердечно-сосудистую систему в плане формирования атеросклероза и атероматоза [9].

Стандартизованные СЦТГ получают путем гидролиза кокосового масла и этерификации ЖК с цепями атомов углерода короче лауриновой ЖК; такие ТГ богаты, в основном, каприловой (С8) и каприновой (С10) ЖК. Лауриновая ЖК имеет высокую коммерческую ценность как предшественник в синтезе антибактериальных фармацевтических препаратов и иных соединений [10]. Кокосовое масло является богатым источником лауриновой ЖК; она составляет примерно половину общего содержания СЦЖК. Более короткие ЖК являются побочными продуктами этого процесса; их используют для получения СЦТГ. В отличие от кокосового масла, С8-С10 ТГ являются жидкими при комнатной температуре. Эти ЖК не используют при приготовлении пищи по причине низкой температуры горения, температуры «образования дыма».

Физико-химические параметры СЦТГ таковы, что клетки не подвергают их депонированию. Клетки не могут использовать их для синтеза *de novo* ни диацилглицеридов, ни фосфатидной кислоты. В то же время, клетки используют эти ЖК как субстрат для активности диацилглицеролацилтрансферазы в реакции переэтерификации; в этой реакции лауриновая ЖК более активна, чем С8 и С10 ЖК. Это означает, что СЦЖК могут быть задействованы в синтезе ТГ, когда позиционные формы ТГ включают и длинноцепочечные ЖК в реакции переэтерификации. Период полураспада (при высоком уровне метаболизма) СЦТГ *in vivo* - более короткий; происходит это потому, что депонировать их в клетках не получается по сравнению с длинноцепочечными ТГ. Кроме того, митохондрии более активно переносят СЦЖК через внутреннюю мембрану в матрикс, не используя специфичный транспортер как карнитинпальмитоил ацилтрансфераза митохондрий. Когда содержание во внеклеточной среде глюкозы является повышенным, активность карнитинового транспортера в митохондриях (по механизму обратной связи) ингибирует продукт реакции - малонил-КоА. Инсулин также может ингибировать активность карнитинпальмитоил ацилтрансферазы и окисление пальмитиновой НЖК в матриксе митохондрий.

Биологическое предназначение кетоновых тел на ступенях филогенеза. Кетоз, в плане компенсации, формируется в ситуации, когда в цитоплазме перипортальных гепатоцитов заканчивается запас гликогена и при низкой секреции инсулина; активация карнитинпальмитоилацилтрансферазы усиливает окисление в матриксе митохондрий, в первую очередь, олеиновой МЖК. В этих условиях митохондрии активируют поглощение СЦЖК и быстро проводят их в матрикс через внутреннюю мембрану. В матриксе митохондрий, в цикле Кребса формируется избыточное количество ацетил-КоА. Часть ацетил-КоА превращается в С4 кетоновые тела; последние выходят из гепатоцитов в кровоток и в межклеточную среду.

Повышенное содержание СЦТГ в пище может приводить к образованию кетоновых тел и при депонировании гликогена в перипортальных гепатоцитах, если СЦЖК эффективно поглощают митохондрии печени, быстро превращая избыточное количество ацетил-КоА в С4 кетоновые тела, в β -гидроксипропанат, ацетоацетат и ацетон. Полагают, что некоторые виды млекопитающих (крысы) могут использовать ацетон в реакции глюконеогенеза из ЖК; происходит это в гепатоцитах по пути: ацетон \rightarrow спирт ацетол \rightarrow метилглиоксаль \rightarrow глиоксаль \rightarrow D-глюкоза [11]. Регуляторные взаимоотношения раннего в филогенезе глюкагона и позднего на ступенях филогенеза инсулина взаимодействуют в образовании С4 кетоновых тел. Это может происходить путем экспрессии ферментов, которые ограничивают параметры образования кетоновых тел при использовании ацетил-КоА в синтезе спирта ХС при активации ключевого фермента β -гидрокси- β -метилглутарил-КоА-редуктазы.

Высокий уровень формирования С4 кетоновых тел при метаболизме С8 и С10 отражают и параметры СЦЖК; согласно им ни апоВ-48, ни микросомальный белок переносящий триглицериды в канальцах эндоплазматического ретикулаума энтероцитов, не структурируют СЦТГ в состав хиломикрон. СЦТГ оказываются в портальной вене в свободной циркуляции. Они, как правило, попадают в портальную циркуляцию непосредственно после абсорбции; хиломикроны не переносят СЦТГ по лимфатическим путям. Это обеспечивает СЦТГ быстрое поступление в печень. Эксперименты на грызунах показали, что С12 лауриновая и С14 миристиновая ЖК частично переносят и лимфа; это и является причиной более длительного нахождения их в организме, по сравнению с С8 каприловой и С10 каприновой ЖК. Приведенные данные указывают, что, введение С8 и С10 среднецепочечных ТГ значительно увеличивает содержание кетоновых тел в плазме крови в течение трех часов. Прием *per os* кокосового масла, в котором доминирует С12 лауриновая ЖК, приводит к менее выраженному и более длительному повышению в плазме крови содержания кетоновых тел.

Особенности метаболизма среднецепочечных жирных кислот; про- и противовоспалительное действие. Особенности физико-химических параметров, при которой СЦТГ, по сравнению с длинноцепочечными ЖК, не могут быть депонированы в ВЖК и ИПА по причине интенсивного метаболизма опреде-

ляет то, что они имеют короткий период полувыведения и вряд ли способствуют формированию метаболического синдрома (патология ВЖК) или ожирения (патология ИПА). Кроме того, среднецепочечные ЖК и СЦТГ активируют биологическую реакцию термогенеза; эти физико-химические особенности ЖК способствуют дифференцированию термогенеза в пероксисомах и синтеза макроэргического АТФ в дыхательной цепи митохондрий. Можно полагать, что термогенез в пероксисомах это процесс, который активирован в условиях физиологической гиперпродукции ацетил-КоА в митохондриях и формирует компенсаторный расход субстрата в процессе термогенеза. Эксперименты на грызунах и наблюдения в клинике показали; если пища содержит сопоставимые количества средне- и длинноцепочечных ЖК, СЦТГ в меньшей мере предрасполагают к формированию ожирению [12]. На этом основании предложено использовать СЦТГ в качестве жиров пациентами, которые твердо намерены контролировать массу тела [13].

Неблагоприятное воздействие избыточного количества ЖК в пище, особенно НЖК с длинной цепью, инициирует не только гиперлиппротеинемию, но и формирование ожирения – патологии ИПА. Это в большей мере относится к избыточному депонированию насыщенных ТГ; в них реакции нарушенного липолиза и формирование эндоплазматического стресса являются причиной формирования синдрома ИР и биологической реакции воспаления [14]. В конце концов, избыток длинноцепочечных ЖК завершает формирование биологической реакции воспаления и гибель клеток по типу запрограммированного биологией апоптоза [15]. В экспериментальных работах на крысах и в клинических наблюдениях показано, что поедание большого количества СЦТГ не формирует синдром ИР, не повышает в плазме крови содержания НЭЖК; хотя приведены и исключения [16].

Длинноцепочечные НЖК, если они накапливаются в цитоплазме оседлых макрофагов, активируют клетки микроглии с усилением в плазматической мембране синтеза гидрофобных эфиров спирта сфингозина, в частности церамидов [17]. Вероятно, это поможет найти связи между формированием гиперлиппротеинемии и нейродегенеративными нарушениями, которые ассоциированы с патологией ЖК и спирта ХС. Хотя СЦЖК это не пальмитиновая НЖК; они не способствуют активации макрофагов; иные авторы сообщают, что, и лауриновая ЖК может активировать макрофаги. Эксперименты с грызунами показали, что вводимые грызунам *per os* СЦТГ оказывают выраженное противовоспалительное действие [18, 19]. Метаанализ данных клинических испытаний показал, что, замена в пище энергетической ценности глюкозы на лауриновую ЖК приводит к повышению в плазме крови содержания апоА-I [20]. Примечательно, что в популяциях южных морей, где кокосовые орехи являются преобладающим источником жиров в пище, частота сердечно-сосудистых заболеваний является низкой [21].

Нейропротективное действие среднецепочечных ЖК и образование кетоновых тел. Данные, полученные в клинике, позволяют полагать, что обогащенная

СЦТГ пища является оптимальной для повышения содержания кетонов в плазме крови, спинно-мозговой жидкости без ограничения углеводов. Формирование избыточного количества кетоновых тел в клетках может быть достигнуто за счет активации метаболических превращений среднецепочечных ЖК, без эпизодов голодания и при наличии в пище углеводов [22]. Не исключено, что увеличение потребления с пищей СЦТГ может оказать позитивное действие, инициировать формирование дополнительного количества кетоновых тел. Этого может быть достаточно для позитивного влияния у пожилых пациентов с начальными проявлениями нарушения когнитивной биологической функции [23]. Эксперименты с лабораторными животными в полной мере подтвердили и клинические наблюдения; это явилось основанием, после чего применение СЦТГ одобрено как «лечебное питание» для пациентов с болезнью Альцгеймера [24].

Снижение метаболизма глюкозы в нейронах головного мозга, которые поражены афизиологичным процессом, является особенностью метаболических нарушений, которые предшествуют формированию симптомов патологического процесса нейродегенеративных изменений [25]. Кетоновые тела, выступая в качестве альтернативного источника биохимической энергии для нейронов мозга, способны облегчать состояние «дефицит энергии» при болезни Альцгеймера, улучшая в определенной мере реализацию когнитивной биологической функции. Кетоновые тела могут быть предшественниками в формировании ацетил-КоА и стать субстратом для выработки энергии (образования АТФ) митохондриями нейронов и астроцитов [26]. Кетоновые тела способствуют и синтезу ацетилхолина, компенсируя при этом дефицит холинэргических гуморальных медиаторов.

Может ли постоянное увеличение содержания кетоновых тел в межклеточной среде при потреблении с пищей СЦТГ оказать позитивное влияние на течение афизиологичного процесса при нейродегенеративных заболеваниях, сказать трудно; улучшить же состояние пациентов, при этом, несомненно можно. Симптоматическое лечение при подобной патологии также может быть применено в виде приема ингибиторов холинэстеразы и СЦТГ с пищей. Для достижения более выраженного нейропротективного действия можно рекомендовать и введение, так называемых «кетоновых эфиров»; они могут повысить содержание кетоновых тел, которые достижимы только в режиме голодания [27].

На модели с трансгенными линиями мышами, образование кетоновых тел в нейронах компенсирует нарушения гликолиза и формирование митохондриями макроэргического АТФ. При добавлении в пищу мышей сложного эфира D-β-гидроксибутирата и R-1,3-бутандиола («кетоновых эфиров») в митохондриях преобладает окисленная форма [НАД⁺], тогда как при действии кетонового эфира - восстановленная форма [НАДН]. Мыши при действии кетонового эфира содержали в нервной ткани более высокие концентрации метаболитов гликолиза и цикла трикарбонных кислот, снижен окислительно-восстановительный

потенциал в матриксе митохондрий, по сравнению с контрольной группой мышей [28]. Чтобы достигнуть более длительного, но не столь выраженного повышения кетоновых тел, желателно использовать кокосовое масло. В нем соотношение С8 каприловой, каприновой С10 и С12 лауриновой ЖК инициирует более длительное, но не столь выраженное увеличение содержания кетоновых тел без выраженных колебаний.

Готовые смеси среднецепочечных триглицеридов, обогащенные лауриновой жирной кислотой. В то же время, применение больших количеств СЦТГ, при желании иметь повышенное содержание *in vivo* кетоновых тел, может спровоцировать нарушение функции желудочно-кишечного тракта. При использовании СЦТГ в форме «кетоновых эфиров» с целью образования кетоновых тел, высокие дозы СЦТГ могут вызвать и диарею.

Логично полагать, что подобные нарушения становятся более редкими, если добавлять в пищу кокосовое масло с более высоким содержанием лауриновой ЖК и меньшим количеством С8 каприловой и С10 каприновой СЦЖК. Еще одним препятствием на пути широкого применения СЦТГ при синдроме ИР и нейродегенеративной патологии является высокая стоимость обогащенных лауриновой кислотой переэтерифицированных спредов, мягких (наливных маргаринов). Текущая стоимость обогащенного лауриновой ЖК литра кокосового масла превышает 30 \$ США. Можно полагать, что коммерческие учреждения фаст-фуда и производители массовой пищевой продукции вряд ли будут заинтересованы в столь дорогом масле. Возможно заинтересованные потребители, которые имеют разумный доход и мотивированный подход, могут позволить себе применять эти масла для приготовления пищи дома.

В последнее время, кроме синдрома ИР и нейродегенеративных заболеваний, позитивное действие СЦТГ стало более ясным и в плане эффективной профилактики атеросклероза и атероматоза артерий эластического типа и коронарной болезни сердца [29]. Уговаривать пациентов воздержаться от животного жира и поедания мяса явно нелегко; вместе с тем - это самый эффективный способ первичной профилактики сердечно-сосудистой патологии у травоядного в филогенеза вида *Homo sapiens*. На ступенях филогенеза, в течение четырех миллиардов лет, далекие предки человека были плотоядными (рыбоядными), но никогда не были мясоедами. Поэтому замена длинноцепочечной пальмитиновой НЖК, пальмитиновых ТГ в составе, в первую очередь, говяжьего мяса, молочного, насыщенного пальмитинового жира (сливочного масла) и жирных молочных продуктов на растительные СЦТГ, является выражено позитивным. В то же время, вкусовые ощущения жареного мяса заменить чем-то сложно. В то же время, накопленный опыт показывает, что богатое лауриновой ЖК кокосовое масло может быть оптимальной заменой; однако, тем не менее, для этого требуется задействовать когнитивную биологическую функцию.

В последнее время производители начали выпускать новый тип СЦТГ, который содержит 30% лау-

риновой ЖК. Считают, что столовая ложка этого жира содержит 12 г среднецепочечных ЖК (лауриновая ЖК - 4,4 г, каприловая ЖК - 3,3 и каприновая 4,0 г) и 1 г длинноцепочечной, чаще олеиновой МЖК. К новым технологическим процессам, которые внедрены на предприятиях масложировой промышленности, можно отнести процесс переэтерификации ЖК с образованием новых позиционных форм ТГ. Переэтерификацией называют реакцию обмена цепями ЖК при взаимодействии молекул двух сложных эфиров. Это один из видов модификации масел и жиров, который позволяет путем образования новых позиционных форм ТГ, повлиять на их физико-химические свойства. В охлажденном состоянии жира переэтерифицированные жиры имеют мелкокристаллическую структуру и однородную пластичную консистенцию.

Переэтерификация, оптимизация состава позиционных форм триглицеридов, первичная профилактика. Процесс переэтерификации (кроме ферментативной при действии *sn-1,3*-специфичной липазы) можно рассматривать как вызванное физико-химическими факторами перемещение цепей ЖК в молекулах и между молекулами ТГ, но, естественно, не случайным образом. Образование новых позиционных форм ТГ в полной мере определено исходным составом ЖК в ТГ. В отличие от химической реакции гидрогенизации, переэтерификация не меняет ни степень насыщения (число двойных связей) и не вызывает химические изменения ЖК, сохраняя состав ЖК исходных ТГ.

Природные масла и жиры по составу ЖК не в полной мере отвечают современным представлениям о здоровом питании, имея не сбалансированный состав ЖК. Применение биохимической реакции переэтерификации позволяет получать специализированные жиры с «желаемым» соотношением ЖК: а) содержание НЖК, МЖК- и ПНЖК и б) отношение ω -6/ ω -3. Комбинируя реакцию переэтерификацию с другими методами модификации, можно получить те или иные продукты с желаемыми физико-химическими и функциональными свойствами. Особенностью переэтерифицированных жиров является способность их кристаллизоваться в наиболее желательную для большинства твердых жиров β -форму. Использование их вместе с основными жирами существенно улучшает физико-химические свойства жиров, их пластичность и гомогенность.

В зависимости от катализатора, выделяют химическую и ферментативную реакцию переэтерификацию; обе они имеют преимущества и недостатки. При химической переэтерификации используют натриевые катализаторы (метилат или этилат натрия); это в дальнейшем требует соблюдения условий хранения жиров: герметичность упаковки, удаление от источников открытого огня, избегая хранения при повышенной влажности. Активаторы истинными катализаторами реакции не являются; они лишь активируют образование глицерата натрия. После реакции катализатор инактивируют и удаляют, поскольку переэтерификация является обратимой. Разрушение активатора реакции проводят путем воздействия воды или ортофосфорной кислоты.

В производственных условиях используют два вида липаз, которые обладают разной специфичностью: неспецифичная липаза катализирует переэтерификацию ЖК одновременно в трех *sn-1-*, *sn-3-* и *sn-2-* позициях трехатомного спирта глицерина, катализируя реакции как с первичными, так и со вторичной его группой. *Sn-1-* и *sn-3-* специфичная липаза катализирует реакции только с первичными спиртовыми группами глицерина. Использование неспецифической липазы не имеет преимуществ перед обычными химическими методами. Применение 1,3-специфичных липаз позволяет производить продукты, которые имеют определенные позиционные формы ТГ; их нельзя получить методом химической переэтерификации. Основное направление использования таких липаз - производство заменителей масла какао - пальмитоил-олеил-стеарат глицерол (ПОС).

При химической переэтерификации образуются метиловые эфиры ЖК; наличие их в переэтерифицированных ТГ вызывает неоднозначное мнение. В то же время, метиловые эфиры ЖК присутствуют в липидах бактерий, грибов и в тканях многих животных. У человека, у млекопитающих метиловые эфиры ЖК содержат клетки поджелудочной железы, печени, эпителии кожи; присутствуют они и в плазме крови. Пока не получено оснований относить экзогенные метиловые эфиры ЖК к канцерогенным агентам. Метиловые эфиры ЖК клетки метаболизируют в пероксисомах, как и другие пищевые жиры, окисляются в конечном итоге до CO_2 и H_2O . И химическую и ферментативную переэтерификацию используют для получения продуктов: а) с меньшим содержанием пальмитиновых позиционных форм ТГ и б) и отсутствием афилологических транс- форм ЖК в ТГ.

Кокосовое масло является субстратом для пищевой промышленности; его часто называют лауриновым растительным маслом, тропическим маслом или кондитерским жиром. Коммерческий продукт является очищенным, отбеленным или дезодорированным кокосовым маслом; в последнее время предприятия используют и нерафинированное кокосовое масло. В 2010 г. в мире произведено около 3,5 млн т.; основные производители: Филиппины (1,7 млн тонн), Индонезия (0,7 млн тонн.) и Индия (0,5 млн тонн). Потребление кокосового масла в США в 2010 г. составило 0,4 млн тонн; среднее потребление 1,28 кг на человека в год. Потребление в Европейском союзе составляло 0,6 млн тонн, при этом аналогичное среднее потребление составляло 1,3 кг на человека. Кокосовое масло устойчиво к окислению и полимеризации; оно стабильно и подходит для приготовления пищи.

При высоком содержании НЖК (92%), кокосовое масло классифицировано вместе с пальмовым маслом и животными жирами в качестве источника насыщенных среднецепочечных ТГ. В последние годы кокосовое масло выделено как источник СЦТГ, физико-химические параметры которых выражено отличаются от длинноцепочечных НЖК. Высокое содержание длинноцепочечных НЖК явно нежелательно в пище травоядного в филогенезе человека. Изготовленные СЦТГ порой явно не являются анало-

гами кокосового масла, поскольку ТГ, которые преобладают в кокосовом масле, различаются по структуре, параметрам абсорбции и метаболизму. Эпидемиологические данные в популяциях, которые потребляют значительное количество кокоса, часто приводятся как доказательства того, что кокосовое масло не оказывает отрицательного воздействия на функцию сердечно-сосудистой системы.

Предшественники вида человек разумный были плотоядными (рыбоядными) в океане, травоядными на суше и не были мясоедами. Использование кокосового масла в пищевых продуктах стало реальным относительно недавно. При анализе более ранних данных, кокосовые масла составляли лишь малую часть традиционной диеты и низкое потребление населением промышленно изготовленных жиров. Потребление кокосового масла и кокосового молока, применение СЦТГ, замена пальмитиновой, животной ЖК на растительные масла можно рассматривать как оптимальную, позитивную, первичную профилактику атеросклероза и атероматоза. Прекращение привычки быть мясоедом реально приведет к успехам в регрессии интимы артерий эластического и смешанного (мышечно-эластического типа), если они еще не стали необратимыми [30].

Постепенно все больше сторонников приобретают убеждение в том, что возвращение биологического вида Человек разумный (*Homo sapiens*) к травоядному (плодоядному) питанию, которое предшественники человека миллионы лет осваивали на ступенях филогенеза, является, единственным способом избавиться в популяции от метаболической пандемии как атеросклероз и атероматоз. Длительное обследование групп пациентов [31] (198 человек), которые сохранили терапию (исключив гиполипидемические препараты), но заменили мясную пищу на травоядную (плодоядную) показали регрессию не только клинических симптомов атеросклероза (гиперлипотеинемии), но и атероматоза по данным коронарографии.

Даже краткое введение лауриновой ЖК понижает артериальное давление как у нормотензивных крыс линии Вистар-Киото, так и спонтанно у гипертензивных крыс линии Шимадзу. Кокосовое масло, богатое лауриновой ЖК снижает артериальное давление и оказывает кардиопротективное действие. Происходит это благодаря антиокислительной активности ЖК. Кокосовое масло (2 мл/день в течение 30 дней) улучшает чувствительность (функцию) барорецепторов, проявлений окислительного стресса у крыс со спонтанной артериальной гипертензией. Полагают, что лауриновая ЖК может быть гуморальным медиатором в регуляции биологической реакции эндотелийзависимой вазодилатации [32].

В большинстве стран, в которых население ограничено потребление животных ЖК, содержание в пище пальмитиновой НЖК все равно остается выше оптимального (рекомендованного) уровня на 10%. В половине же стран, потребление населением ПНЖК остается ниже рекомендуемого уровня. Снижение поступления НЖК не сопровождается столь же желаемое повышение потребления с пищей ПНЖК; пока не происходит замены НЖК на ПНЖК в целях пер-

вичной профилактики ишемической болезни сердца (ИБС).

Существуют документы о среднем содержании ТГ и ЖК в пище жителей разных стран [33]. При использовании системного подхода к потреблению жиров в популяциях разных стран мира является единственной причиной предотвратить формирование острого коронарного синдрома. Основные ограничения получаемых данных: гетерогенность источников данных, методов отбора проб и диетические оценки; это способствует увеличению наблюдаемых различий между жителями разных стран. Следует понять и то, что национальные обследования питания также имеют свои ограничения. Даже данные крупных популяционных протоколов не всегда являются репрезентативными, особенно в таких странах, как Индия и Малайзия.

Важным ограничением является неполная информация о содержании ЖК в продуктах питания; это может легко привести к недооценке реального потребления НЖК, МЖК и ПНЖК. К примеру, сумма НЖК + МЖК + ПНЖК порой оказывается ниже, чем сумма общего потребления ТГ. Существенное различие между общим содержанием жира и суммой НЖК + МЖК + ПНЖК может указывать, что для большинства продуктов нет данных о составе и содержании ЖК.

В-третьих, данные о потреблении жирных кислот авторы сообщают на основе ограниченного числа стран во всем мире. Хотя данные доступны для большинства развитых регионов, мало данных относительно стран Азии, Африки и Южной Америки. Относительно большой вклад НЖК в выработку энергии в развитых странах, вероятно, обусловлен высоким потреблением продуктов, богатых НЖК, таких как мясо и молочные продукты [34]. Более низкое потребление НЖК, как правило, сочетается со снижением и общего потребления жиров. Одновременно, среднее потребление ПНЖК в меньшей мере зависит от общего потребления жиров; реально потребление ПНЖК составляет никак не выше рекомендованного уровня - 6%. Различия в потреблении ПНЖК между жителями разных стран, видимо, не обусловлены различиями в общем объеме потребления жиров, а определено национальными особенностями [35].

Широкое использование подсолнечного масла, как показано, обеспечивает относительно высокое потребление ННЖК (в частности, линолевой кислоты). С другой стороны, широкое использование кокосового масла в кулинарии в западных странах является важным фактором как для приема с низким содержанием ННЖК, так и высоким содержанием НЖК. Вполне вероятно, что большая часть различий в потреблении жиров в разных популяциях отражает основные различия в потреблении растительных масел и типе потребляемых жиров и масел. Снижение потребления НЖК и замена их на ПНЖК всегда окажет существенное влияние на частоту распространения ИБС в популяции.

Примеры положительного влияния здравоохранения представлены опытом в Финляндии и Польше; в этих странах замещение НЖК на ННЖК и ПНЖК в

популяции привели к снижению смертности от ИБС. В США в последние десятилетия реально снизился уровень общего потребления жиров, как субстрата для выработки энергии, но, одновременно, увеличился вклад сахаров и рафинированных углеводов; для первичной профилактики ИБС подобные изменения в питании пациентов пользы не приносят [36, 37]. В информации общественного здравоохранения и профилактической его направленности реально уделять особое внимание замене НЖЭК на МЖК, ННЖК и на ПНЖК. Все рекомендации следует направить на эффективную замену пальмитиновой НЖК в пище на МЖК, ННЖК и ПНЖК; биологически это является целесообразным [38].

Концентрация спирта ХС в плазме крови не столь зависима от содержания в пище С16:0 пальмитиновой и С14:0 миристиновой НЖК; в значительной мере эта зависимость касается ХС-ЛПНП. Одновременно параллельно повышению в плазме крови содержания С18:0 стеариновой и С12:0 лауриновой НЖК [39] происходит достоверное снижение ХС-ЛПНП. Это проясняет не столь простую зависимость между длиной НЖК, действием среднецепочечных и длинноцепочечных НЖК [40], проявляя варианты выраженной биологической специфичности. Митохондрии поглощают и окисляют в матриксе с высокой константой скорости реакции С8 каприловую, менее С10 каприловую ЖК [41], в меньшей мере внутренняя мембрана митохондрий проницаема для С14 миристиновой ЖК; и она совсем не проницаема для С16:0 пальмитиновой НЖК. В то же время, митохондрии с большей активностью поглощают и окисляют более длинноцепочечную С18:0 стеариновую НЖК. Определено это тем, что митохондрии, на самом деле, поглощают, окисляют не саму стеариновую НЖК, а образованную из нее эндогенно ω -9 С18:1 олеиновую цис- МЖК, при экспрессии инсулином стеарил-КоА-дегидрогеназы, в первую очередь, в гепатоцитах.

Первым, ранним тестом, который указывает на поступление с пищей повышенного, еще физиологического количества пальмитиновой НЖК является гипертриглицеридемия. Она отражает физиологичное повышение в плазме крови содержание пальмитиновой НЖК в составе олеиновых позиционных форм ТГ как ООО – ПОО - ООП и ПОП. Когда повышение в пище пальмитиновой НЖК становится афизиологичным, её содержание возрастет в составе пальмитиновых позиционных ТГ как ОПО – ППО – ОПП и ППП. Тестом этого является повышение в плазме крови содержания ХС-ЛПНП. И с этого момента начинается формирование вначале атеросклероза, а далее формируется процесс компенсации, которым является атероматоз интимы артерий эластического и смешанного типа. По сути, физиологичный процесс сбора и утилизации «биологического мусора» из внутрисосудистого локального пула межклеточной среды становится в силу афизиологичного содержания в крови пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП, основой ИБС и острого коронарного синдрома.

Основываясь на последних наблюдениях в клинике, замена в пище НЖК на ННЖК и ПНЖК умеренно

снижает риск ИБС на 10% при 5-процентном замещении энергетической ценности; тогда как замена НЖК на углеводы (глюкозу) проявляет неопределенное действие. Доказано афизиологичное влияние пальмитиновой НЖК на активность биологической реакции эндотелийзависимой вазодилатации, на резистентность к инсулину. При этом многие исследования не выявляют явно позитивного действия соблюдения пациентами диеты, которая свойственна виду *Homo sapiens*. Пора понять, что в филогенезе человек сформировался как травоядный вид с плотоядным (рыбоядным) прошлым из жизни в океане. Кормление новорожденных молоком досталось человеку от периода плотоядного («рыбоядного») питания при жизни предков человека в океане в течение миллионов лет [4]. Желание многих особей вида *Homo sapiens*, «мясоедов» вернуться к плотоядному питанию обернется (оборачивается) патологическим издержками в онтогенезе особей в форме острого коронарного синдрома и нарушения мозгового кровообращения, инсульта и инфаркта миокарда.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 5 – 41
см. REFERENCES)

2. Сажина Н.Н., Титов В.Н., Евтеева Н.М., Ариповский А.В. Изменение суммарной ненасыщенности жирных кислот липидов плазмы крови больных артериальной гипертензией в глюкозотолерантном тесте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(2): 74 – 80.
4. Титов В.Н. *Клиническая биохимия. Курс лекций*. М.: ИНФРА-М; 2017.

REFERENCES

1. Xiong Z., Xu H., Ärnlov J., Qureshi A.R., Cederholm T., Sjögren P. Nonesterified fatty acids and cardiovascular mortality in elderly men with CKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2015; 10(4): 584 - 91.
2. Sazhina N.N., Titov V.N., Evteeva N.M., Aripovskiy A.V. Change in total unsaturation of fatty acids of blood plasma lipids in patients with arterial hypertension in a glucose-tolerant test. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(2): 74 – 80. (in Russian)
3. Leahy J.L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch. Med. Res.* 2005; 36(3): 197 - 209.
4. Titov V.N. *Clinical biochemistry. Course of lectures: Textbook. [Klinicheskaya biokhimiya. Kurs lekziy: uchebnoye posobiye]*. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
5. Yoshinaga K., Obi J., Nagai T., Iioka H., Yoshida A., Beppu F., Gotoh N. Quantification of triacylglycerol molecular species in edible fats and oils by gas chromatography-flame ionization detector using correction factors. *J. Oleo. Sci.* 2017; 66(3): 259 - 68.
6. Takeuchi H., Noguchi O., Sekine S., Kobayashi A., Aoyama T. Lower weight gain and higher expression and blood levels of adiponectin in rats fed medium-chain TAG compared with long-chain TAG. *Lipids*. 2006; 41(2): 207 - 12.
7. St-Onge M.P., Mayrhoen B., O'Keefe M., Kissileff H.R., Choudhury A.R., Laferrère B. Impact of medium and long chain triglycerides consumption on appetite and food intake in overweight men. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2014; 68(10): 1134 - 40.
8. 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.
9. Wu G.H., Zaniolo O., Schuster H., Schlotzer E., Pradelli L. Structured triglycerides versus physical mixtures of medium- and long-chain triglycerides for parenteral nutrition in surgical or critically ill adult patients: Systematic review and meta-analysis. *Clin. Nutr.* 2017; 36(1): 150 - 61.
10. Bourque C., St-Onge M.P., Papamandjaris A.A., Cohn J.S., Jones P.J. Consumption of an oil composed of medium chain triacylglycerols, phytosterols, and N-3 fatty acids improves cardiovascular risk profile in overweight women. *Metabolism*. 2003; 52(6): 771 - 7.
11. Dmitriev L.F. Biological membranes are nanostructures that require internal heat and imaginary temperature as new, unique physiological parameters related to biological catalysts. *Cell. Biochem. Biophys.* 2011; 59(3): 133 - 46.
12. Mumme K., Stonehouse W. Effects of medium-chain triglycerides on weight loss and body composition: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Acad. Nutr. Diet.* 2015; 115(2): 249 - 63.
13. Szendroedi J., Yoshimura T., Phielix E., Koliaki C., Marcucci M., Zhang D. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(26): 9597 - 9602.
14. Gao D., Pararasa C., Gao D., Pararasa C. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(26): 9597 - 9602.
15. Mugabo Y., Mukaneza Y., Renier G. Palmitate induces C-reactive protein expression in human aortic endothelial cells. Relevance to fatty acid-induced endothelial dysfunction. *Metabolism*. 2011; 60(5): 640 - 8.
16. Nagao K., Yanagita T. Medium-chain fatty acids: functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Pharmacol. Res.* 2010; 61(3): 208 - 12.
17. Huang S., Rutkowsky J.M., Snodgrass R.G., Ono-Moore K.D., Schneider D.A. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J. Lipid. Res.* 2012; 53(9): 2002 - 13.
18. Kono H., Fujii H., Asakawa M., Yamamoto M., Matsuda M., Maki A., Matsumoto Y. Protective effects of medium-chain triglycerides on the liver and gut in rats administered endotoxin. *Ann. Surg.* 2003; 237(2): 246 - 55.
19. Carlson S.J., Nandivada P., Chang M.I., Mitchell P.D., O'Loughlin A. The addition of medium-chain triglycerides to a purified fish oil-based diet alters inflammatory profiles in mice. *Metabolism*. 2015; 64(2): 274 - 82.
20. Mensing R.P., Zock P.L., Kester A.D., Katan M.B. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 77(5): 1146 - 55.
21. Suzuki M., Takaishi S., Nagasaki M., Onozawa Y., Iino I., Maeda H., Komai T., Oda T. Medium-chain fatty acid-sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(15): 10684 - 91.
22. Maalouf M., Rho J.M., Mattson M.P. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain. Res. Rev.* 2009; 59(2): 293 - 315.
23. Paoli A., Bianco A., Damiani E., Bosco G. Ketogenic diet in neuromuscular and neurodegenerative diseases. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 474296.
24. Roman M.W. Axona (Accera, Inc): a new medical food therapy for persons with Alzheimer's disease. *Issues. Ment. Health. Nurs.* 2010; 31(6): 435 - 6.
25. Liu Y., Liu F., Grundke-Iqbal I., Gong C.X. Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett.* 2008; 582(2): 359 - 64.
26. Henderson S.T. Ketone bodies as a therapeutic for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 2008; 5(3): 470 - 80.
27. Veech R.L. Ketone ester effects on metabolism and transcription. *J. Lipid. Res.* 2014; 55(10): 2004 - 6.
28. Pawlosky R.J., Kemper M.F., Kashiwaya Y., King M.T., Mattson M.P., Veech R.L. Effects of a dietary ketone ester on hippocampal glycolytic and tricarboxylic acid cycle intermediates and amino acids

- in a 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2017; 141(2): 195 - 207.
29. Esselstyn C.B., Gendy G., Doyle J., Golubic M., Roizen M.F. A way to reverse CAD? *J. Fam. Pract.* 2014; 63(7): 356-364b.
30. Lau K.K., Wong Y.K., Chan Y.H., Li O.Y., Lee P.Y., Yuen G.G. Mediterranean-style diet is associated with reduced blood pressure variability and subsequent stroke risk in patients with coronary artery disease. *Am. J. Hypertens.* 2015; 28(4): 501 - 17.
31. Esselstyn C.B., Gendy G., Doyle J., Golubic M., Roizen M.F. A way to reverse CAD? *J. Fam. Pract.* 2014; 63(7): 356 - 364b.
32. Alves N.F., Porpino S.K., Monteiro M.M., Gomes E.R., Braga V.A. Coconut oil supplementation and physical exercise improves baroreflex sensitivity and oxidative stress in hypertensive rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2015; 40(4): 393 - 400.
33. Harika R.K., Eilander A., Alssema M., Osendarp S.J., Zock P.L. Intake of fatty acids in general populations worldwide does not meet dietary recommendations to prevent coronary heart disease: a systematic review of data from 40 countries. *Ann. Nutr. Metab.* 2013; 63(3): 229 - 38.
34. Micha R., Mozaffarian D. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: a fresh look at the evidence. *Lipids.* 2010; 45(10): 893 - 905.
35. Kamisah Y., Periyah V., Periyah V., Lee K.T., Noor-Izwan N., Nurul-Hamizah A., Nurul-Iman B.S. Cardioprotective effect of virgin coconut oil in heated palm oil diet-induced hypertensive rats. *Pharm. Biol.* 2015; 53(9): 1243 - 9.
36. Willett W.C., Leibel R.L. Dietary fat is not a major determinant of body fat. *Am. J. Med.* 2002; 113 Suppl 9B: 47S - 59S.
37. Gifford K.D. Dietary fats, eating guides, and public policy: history, critique, and recommendations. *Am. J. Med.* 2002; 113 Suppl 9B: 89S - 106S.
38. FAO/WHO. Report of a joint: WHO/FAO expert consultation. Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. Geneva, World Health Organization. 2003.
39. Lopez D., Niesen M., Bedi M., McLean M.P. Lauric acid dependent enhancement in hepatic SCPx protein requires an insulin deficient environment. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids.* 2008; 78(2): 131 - 5.
40. Xue C., Liu Y., Wang J., Zhang R., Zhang Y., Zhang J., Zhang Y. Consumption of medium- and long-chain triacylglycerols decreases body fat and blood triglyceride in Chinese hypertriglyceridemic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2009; 63(7): 879 - 86.
41. 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.

Поступила 14.12.18

Принята к печати 25.12.18

ЦИТОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Банковская Л.А., Щёктова А. П., Малютина Н. Н.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ПАРАМЕТРЫ РИНОЦИТОГРАММЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ МЕТАНОЛА И ФОРМАЛЬДЕГИДА В УСЛОВИЯХ ПРОИЗВОДСТВА

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера» Минздрава РФ, 614000, Пермь, Россия

Данное исследование посвящено оценке состояния слизистой оболочки верхних дыхательных путей у работников химического производства метанола и формальдегида. Обследованы 450 работников, у которых оценивали риноцитогрaмму (РЦГ). В результате проведенного исследования установили, что у лиц со стажем работы до 10 лет в условиях производства с метанолом и формальдегидом в РЦГ чаще определяются признаки хронического воспаления. У пациентов со стажем работы более 10 лет устанавливаются морфологические признаки защитных и дегенеративных изменений мерцательного эпителия, и имеют высокую степень связи развития защитных изменений с воздействием химических веществ (RR) = 2,71, этиологическая доля (EF) = 56,4% и развития дегенеративных изменений (RR=3,28, EF=65,4%). Полученные результаты рассматриваются авторами как биомаркеры развития профессионально обусловленного поражения верхних дыхательных путей.

Ключевые слова: риноцитогрaмма; метанол; формальдегид.

Для цитирования: Банковская Л.А., Щёктова А. П., Малютина Н. Н. Количественные и качественные параметры риноцитогрaммы при воздействии метанола и формальдегида в условиях производства. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (2): 78-82. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-78-82>

Bankovskaya L.A., Shchekotova A.P., Malyutina N.N.

THE QUANTITATIVE AND QUALITATIVE PARAMETERS OF RHINOCYTOGRAMS IN METHANOL AND FORMALDEHYDE IMPACT IN PRODUCTION ENVIRONMENT

SBEI HPT "Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 614000, Perm, Russia

This study is devoted to assessing the state of the mucous membrane of the upper respiratory tract of the workers of chemical production of methanol and formaldehyde. A total of 450 workers were examined by rhinocytogram (RCH) evaluation. As a result of the study, studies have found that people with work experience of up to 10 years in the production of methanol and formaldehyde in the RCH the signs of chronic inflammation is more likely to be detected. More experienced patients (more than 10 years of work experience) studies have found the establishment of morphological signs of protective and degenerative changes in ciliated epithelium, and there is a high degree of connection between the development of protective changes and the exposure to chemicals (RR = 2.71, etiological share, EF = 56.4%) and the development of degenerative changes (RR = 3.28, EF = 65.4%). These results are considered by the authors as the biomarkers of the development of a professionally conditioned lesion of the upper respiratory tract.

Key words: rhinocytogram; methanol; formaldehyde.

For citation: Bankovskaya L.A., Shchekotova A.P., Malyutina N.N. The quantitative and qualitative parameters of rhinocytograms in methanol and formaldehyde impact in production environment. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (2): 78-82 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-78-82>

For correspondence: Bankovskaya L.A., doctor of medical Sciences, associate Professor of the Department of faculty therapy № 2 and occupational diseases with the course of occupational diseases; e-mail: taranenko-la@yandex.ru

Information about authors:

Bankovskaya L.A. <https://orcid.org/0000-0003-4267-8031>

Shchekotova A.P. <http://orcid.org/0000-0003-0298-2928>

Malyutina N.N. <http://orcid.org/0000-0003-0133-569X>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 30.09.2018
Accepted 21.01.2019

Для корреспонденции: Банковская Людмила Андреевна, д-р мед. наук, доц. каф. факультетской терапии № 2 и проф. болезней с курсом профболезней; e-mail: taranenko-la@yandex.ru.

Слизистая верхних дыхательных путей служит первичным барьером для различных факторов окружающей среды, в том числе химических патогенов. Полость носа в передних отделах выстлана многослойным плоским неороговевающим эпителием,

большая часть полости носа выстлана многоядным цилиндрическим реснитчатым эпителием [1]. Развитие патологического процесса в слизистой верхних дыхательных путей может протекать латентно и служить фактором развития различных заболеваний системы дыхания [2].

Исследование риноцитограммы (РЦГ) при микроскопии мазков-отпечатков со слизистой оболочки носа является простым атравматичным методом оценки состояния слизистой системы дыхания [3, 4]. РЦГ дает представление о состоянии эпителиальной выстилки верхних дыхательных путей, наличии лейкоцитов и ориентировочно оценивает характер микрофлоры [5, 6].

Летучие химические вещества оказывают раздражающее действие на слизистые за счет цитотоксического воздействия, что ведет к развитию воспалительных, аллергических, атрофических изменений в носоглотке [7, 8]. В доступной литературе не найдено работ по изучению слизистой оболочки верхних дыхательных путей при воздействии метанола и формальдегида в условиях производства методом РЦГ.

Цель исследования - оценить качественные и количественные показатели РЦГ у работников производства метанола и формальдегида.

Материал и методы. Обследовано 450 работников химического производства метанола и формальдегида. Выделены две основные группы: 1-я группа – работники, контактирующие с метанолом и формальдегидом ($n=366$), 2-я группа – работники того же предприятия, однако не контактирующие непосредственно с вредными химическими веществами ($n=84$). В контрольную группу включили 20 здоровых лиц. Средний возраст составлял в 1-й группе

$40,20 \pm 8,81$, во 2-й группе $41,02 \pm 9,47$ лет, в группе здоровых лиц $38,21 \pm 7,36$. Средний стаж работы на предприятии в 1-й группе составил $15,08 \pm 6,17$, во 2-й группе - $14,06 \pm 6,98$ лет. Среди лиц, непосредственно контактирующих с метанолом и формальдегидом, $41,8\%$ ($n=153$) работали с превышением ПДК по формальдегиду и метанолу до 3,4 раз.

Взятие мазков со слизистой среднего носового хода проводилось стерильным тампоном. Цитологический препарат после высушивания окрашивали красителем-фиксатором Май-Грюнвальда в течение 3 мин, далее краской Романовского-Гимзе 30 минут. Исследование стеклопрепарата проводили на микроскопе Micros MC50 с масляной иммерсией при увеличении 100×10 .

Нами был разработан алгоритм количественной оценки цитологической картины РЦГ, так как в представленных в литературе нормативах подсчет в % предлагается только для клеток крови (лейкоцитов), мы предлагаем проводить подсчет и эпителиальных клеток. [9]. Предварительно препарат просматривался под малым увеличением для оценки клеточности мазка и морфологической картины в целом. Затем проводили подсчет в тонких местах препарата методом «зубчатой стены», аналогично подсчету лейкоформулы крови на лейкоцитарном счетчике. Значение порога устанавливалось 100, результат выражали в %. В подсчет включали эпителий (отдельно цилиндрический, метаплазированный, плоский, с дегенеративными признаками, в том числе в виде голых «ядер»), лейкоциты (нейтрофилы, эозинофилы, моноциты, лимфоциты, базофилы, макрофаги, тучные клетки). Помимо «формулы» РЦГ, в описании препарата отмечали общую клеточность мазка: скудный – единич-

РИНОЦИТОГРАММА

ФИО _____ Возраст _____
 Диагноз: _____

Параметр	Результат, %	Референтные значения, % ($M \pm \sigma$)
Эпителий плоский		0 – 30
Эпителий цилиндрический		0 – 1
Эпителий метаплазированный		0 – 5
«Голые ядра»		5 – 10
Нейтрофилы		до 60
Эозинофилы		0 – 1
Лимфоциты		0 – 1
Моноциты		0 – 1
Макрофаги		0
Базофилы		0
Тучные клетки		0
Эритроциты		0
Микрофлора		кокки (до +)
Слизь (+, ++, +++)		до +
Фагоцитоз (+, ++, +++)		–
Расположение клеток: + раздельно лежащие, ++ группы, +++ пласты (подчеркнуть)		
Общая клеточность: + единичные клетки в препарате, + единичные в поле зрения, +++ десятки клеток в поле зрения (подчеркнуть)		

Заключение: _____

Цитологические синдромы по данным РЦГ у лиц первой и второй группы, %

Цитологические синдромы	1-я группа работников (в контакте с метанолом и формальдегидом), n=366	2-я группа работников (вне контакта с метанолом и формальдегидом), n=84
Неспецифическое воспаление	45,9 (n=168)	51,1 (n=43)
Защитные изменения	24,6 (n=90)	10,7 (n=9)
Дегенеративные изменения	17,2 (n=63)	5,9 (n=5)
Вазомоторные проявления	6,8 (n=25)	19 (n=1)
Аллергическое воспаление	3 (n=11)	1,2 (n=1)
Хроническое воспаление	2,5 (n=9)	11,9 (n=10)

ные клетки в поле зрения, умеренный – небольшие группы до 3-5 клеток в поле зрения, многоклеточный – пласты, десятки клеток в поле зрения. Оценивали расположение эпителия (группы, пласты, одиночные клетки), признаки дегенеративных изменений цилиндрического эпителия, наличие слизи и микрофлоры (кокки, палочки). Нами разработана модификация бланка РЦГ.

В результате цитологического исследования формулировалось заключение в виде синдромного цитологического диагноза: неспецифическое воспаление, аллергическое воспаление, вазомоторные изменения, дегенеративные, защитные изменения слизистой носа [1, 9].

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы “Statistica 6.0”. Данные представлены в виде средней арифметической величины и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$). При анализе данных рассчитывали отношение шансов (OR), доверительный интервал (95%CI), относительный риск (RR) и этиологическая доля (EF, %). Степень связи нарушений здоровья с работой оценивали по шкале Денисова Э.И. (2003) с помощью интерактивного справочника «Профессиональный риск».

Результаты. При оценке РЦГ по разработанной нами методике для здоровых лиц характерна в целом скудная общая клеточность мазка, раздельно лежащие клетки, среди лейкоцитов преобладают нейтрофилы, как клетки обеспечивающие первичную неспецифическую защиту от различных патогенов. В контрольной группе в цитологических препаратах встречаются единичные клетки цилиндрического эпителия в редких полях зрения ($0,13 \pm 0,1\%$), небольшие пласты клеток поверхностного слоя плоского эпителия ($26,9 \pm 9,1\%$), единичные метаплазированные эпителиальные клетки. Миграция нейтрофилов на фоне низкой клеточности мазка в целом была слабая, хотя в формуле их процент достигал $45,0 \pm 7,9\%$.

У лиц, работающих на химическом производстве метанола и формальдегида, патология верхних дыхательных путей отражена в диагнозах только у 1,3% обследованных. А при изучении мазков-отпечатков со слизистой оболочки носа у 100% работающих первой и второй группы выявлены патологические изменения в виде воспалительных, защитных, дегенератив-

ных, аллергических, вазомоторных проявлений. В большинстве случаев общая клеточность в препаратах была умеренной, эпителий располагался в основном группами. Признаки неспецифического, возможно микробного, воспаления представлены нейтрофилизом до $80,03 \pm 1,02\%$, незначительной метаплазией эпителия в $7,67 \pm 0,92\%$ случаев, увеличением количества цилиндрического эпителия – $6,38 \pm 0,92\%$, встречаются моноциты, в ряде случаев отмечено наличие скудной, чаще кокковой микрофлоры. У ряда пациентов выявлены признаки хронического катарального воспаления с небольшим количеством лимфоцитов. Хроническое воспаление с иммунным компонентом характеризуется наличием, помимо лимфоцитов, единичных макрофагов и тучных клеток, небольшого количества нейтрофилов на фоне метаплазии и дегенеративных изменений цилиндрического эпителия слизистой носа. Защитные изменения характеризуются трансформацией клеток мерцательного цилиндрического эпителия в метаплазированный созревающий и зрелый многослойный плоский эпителий, который составил $56,1 \pm 1,5\%$ подсчитанных клеток в РЦГ. Морфологическая картина дегенеративных изменений характеризуется увеличением количества «голых ядер» до $64,4 \pm 3,4\%$, дегенеративными изменениями цилиндрического эпителия в виде потери ресничек, неровного контура цитоплазмы и ядра, вакуолизации цитоплазмы и сопровождается небольшим нейтрофилизом ($11,56 \pm 2,14\%$) (рисунок, см.обложку).

При вазомоторных изменениях, по сравнению с другими цитологическими синдромами, в РЦГ увеличено преобладает цилиндрический эпителий до $21,05 \pm 2,87\%$. Признаки аллергического воспаления характеризуются увеличением количества эозинофилов до $69,4 \pm 7,6\%$ и незначительным нейтрофилизом ($5,6 \pm 2,5\%$).

По результатам исследования РЦГ выявлены различные цитологические синдромы (см. таблицу).

Определено достоверное превышение ПДК по формальдегиду в 1-й группе в сравнении с лицами, не контактирующими с вредными веществами (2-я группа), сопровождалось преимущественно воспалением (до 48,1%), защитными (24,6%) и дегенеративными изменениями (17,2%) эпителия слизистой носа. В 1-й группе обследованных признаки неспецифического воспаления и аллергические изменения характерны для более молодых работников со стажем работы до 10 лет, у более стажированных работников выявляются преимущественно защитные и дегенеративные изменения эпителия. У лиц 2-й группы несколько чаще выявлялись признаки воспаления – в целом у 63% обследованных и вазомоторные проявления в 19% случаев.

Нужно подчеркнуть, что цитологический диагноз «Воспаление» определялся не столько преобладанием нейтрофилов в РЦГ, сколько сочетанием нейтрофилиза с повышенной клеточностью препарата. Вазомоторные изменения проявляются увеличением числа железистых эпителиальных клеток в сочетании со значительным количеством «голых» ядер.

Следует отметить, что в соответствии с Руководством Р 2.2.2006-05 [10] условия труда обследованных

пациентов первой группы являются «вредными» со степенью вредности – 3.2 (с превышением ПДК трудятся 41,8% работающих). У остальных работников той же группы (58,2%), как и у лиц второй изучаемой группы условия труда расценены как «допустимые».

Обсуждение. Формальдегид и метанол на слизистую оболочку верхних дыхательных путей оказывают раздражающее и сенсibiliзирующее действие, что создает условия для присоединения инфекции и способствует развитию воспалительным изменениям [11, 12]. При дальнейшем воздействии аэрогенных вредных веществ с развитием хронического воспаления возникают дегенеративные изменения мерцательного эпителия, потеря ресничек. Дегенеративные процессы в слизистой в свою очередь поддерживают хронизацию воспаления [13] и морфологически в РЦГ отражается появлением отдельно лежащих «голых» ядер [9]. Усиленная десквамация клеток ведет к развитию защитных преобразований в слизистой оболочке в виде метаплазии по типу трансформации клеток железистого эпителия в многослойный плоский [1]. В норме небольшой пласт такого эпителия локализуется между многослойным плоским неороговевающим эпителием, выстилающим наружные зоны полости носа, единичные клетки могут попадать в цитологический препарат. А на фоне токсического воздействия, вторичного воспаления также увеличивается количество клеток метаплазированного эпителия, образующегося из цилиндрического эпителия, который обладает более выраженными защитными свойствами по сравнению с железистым цилиндрическим эпителием. В исследованиях, оценивающих изменения РЦГ при патологии слизистой дыхательных путей, в том числе при аэрогенном воздействии токсических веществ, не отмечено увеличение метаплазированного эпителия. В частности, Протасов П.Г. и соав. (2006), выявляют увеличение плоского эпителия, особенно большое количество, до 50-80%, при вазомоторном и вирусном рините, а на снимках стеклопрепаратов представлен именно метаплазированный эпителий [9]. С позиций цитологии, хотя метаплазированный эпителий и напоминает глубокий парабазаальный слой плоского эпителия, но, как морфологически так и функционально, от него отличается. И увеличение метаплазированного эпителия в препаратах свидетельствует о патологическом процессе в слизистой верхних дыхательных путей не зависимо от этиологии [1].

Определена высокая степень связи выявленных нарушений с влиянием химических веществ. Расчет относительного риска показал достоверно высокий риск развития патологии верхних дыхательных путей у работников химического производства метанола и формальдегида. Так, для защитных изменений $OR=2,71$ (95%CI 1,28-5,73); $\chi^2=16,87$ (табличная 3,8); $RR\ 2,29$ (95%CI 1,23-4,27); $EF=56,4\%$, что расценивается как высокая степень связи с работой [9].

Дегенеративные (дистрофические) изменения в эпителии развиваются за счет цитопатического действия микрофлоры, аллергенов, химических аэрозолей. Потеря ресничек, вакуолизация ядер и цитоплаз-

мы, гипохромия, оксифилия цитоплазмы, нечеткость контуров цитоплазмы вплоть до полного ее разрушения с появлением «голых» ядер, карио рексис и кариолизис свидетельствуют дегенеративном процессе. Такие изменения в виде преимущественного увеличения «голых» ядер часто выявляются при хроническом воспалении, аллергическом процессе, вазомоторном рините, в том числе при сенсibiliзации при воздействии формальдегида [9, 12, 13]. Дегенеративные изменения слизистой оболочки носа у лиц, контактирующих с изучаемыми химическими вредностями, имеют высокую степень связи патологии с работой. Так, $OR=3,28$ (95%CI 1,25-8,57); $\chi^2=5,9$ (табличная 3,8); $RR\ 2,89$ (95%CI 1,22-6,8); $EF=65,4\%$, [10, 12, 14].

Синдром неспецифического воспаления и вазомоторные проявления у лиц, работающих непосредственно на химическом производстве, встречается несколько реже, чем во второй группе. Необходимо подчеркнуть, что изменения эпителия слизистой носа при аэрогенном воздействии химических веществ, могут проявляться субклинически [12]. Это же проявилось при проведенном нами обследовании работающих на производстве формальдегида и метанола: клинически явная патология со стороны верхних дыхательных путей выявлена у 1,3% лиц.

Таким образом, работники, непосредственно контактирующие с метанолом и формальдегидом, имеют высокий и очень высокий риск развития патологии верхних дыхательных путей, связанных с работой. Изменения, выявленные при исследовании РЦГ, можно рассматривать как ранние, в основном доклинические, проявления поражения слизистой оболочки носа, имеющие важное значение в оценке аэрогенного влияния метанола и формальдегида.

Выводы

1. Качественная и количественная оценка РЦГ может использоваться для диагностики, прогнозирования и оценки рисков развития профессионально обусловленных изменений слизистой оболочки верхних дыхательных путей при работе на производстве в контакте с метанолом и формальдегидом.

2. Повышенный уровень нейтрофилов и метаплазированного эпителия в РЦГ, указывающие на проявления хронического воспаления у лиц со стажем работы до 10 лет, можно рассматривать как ранние признаки поражения верхних дыхательных путей при воздействии метанола и формальдегида.

3. Преобладание в РЦГ морфологических признаков защитных и дегенеративных изменений мерцательного эпителия у работающих на производстве метанола и формальдегида более 10 лет можно расценить как биомаркеры развития профессионально обусловленного поражения верхних дыхательных путей.

4. Воспалительные и вазомоторные цитологические проявления при исследовании РЦГ у работников того же предприятия, но не контактирующих непосредственно с вредными химическими веществами, могут быть проявлением реакции на возможное минимальное влияние на территории производства метанола и формальдегида на слизистую носа.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шапиро Н.А. Цитологическая диагностика заболеваний легких. Цветной атлас. М.: Медицина; 2005.
2. Рязанцев С.В., Хмельницкая Н.М., Тырнова Е.В. Патофизиологические механизмы хронических воспалительных заболеваний слизистой оболочки верхних дыхательных путей. *Вестник отоларингологии*. 2001; 6: 56-9.
3. Аппельганс Т.В., Чиняева Н.С., Махов В.А., Кузьмина Л.В. Значимость морфологического исследования в диагностике риносинуситов. *Врач-аспирант*. 2006; 3: 208-13.
4. Бархина Т.Г., Гусниев С.А., Гушин М.Ю., Утешева В.А., Черников В.П. Клинико-морфологическая характеристика различных форм ринитов. *Морфологические ведомости*. 2017; 2: 14-20.
5. Журавская Н.С., Виткина Т.И., Круковская Е.А., Наставшева Т.А. Метод мазков-отпечатков со слизистой носа в диагностике заболеваний органов дыхания. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2002; 2: 40-2.
6. Зими́на В.А., Птицына А.И., Соколов И.И. Риноцитогрaмма – диагностическое значение лабораторного исследования. Фундаментальные проблемы науки. Сборник статей. Уфа: ООО «Аэтерна»; 2016.
7. Бова А.А., Горохов С.С. Военная токсикология и токсикология экстремальных ситуаций. Минск: БГМУ; 2005.
8. Schlottmann U. Formaldehyde SIDS Initial Assessment Report For SIAM. Paris; 2002: 395.
9. Протасов Н.С., Бурмистрова Т.В., Бейлина В.Б., Казначеева Е.И. Экфолиатный цитологический анализ в дифференциальной диагностике органов уха, горла, носа. *Новости клинической цитологии России*. 2013; 1-2: 54.
10. Руководство Р 2.2.1766-03 «Руководство по оценке профессионального риска для здоровья работников. Организационно-методические основы, принципы и критерии оценки». Утверждено Главным государственным санитарным врачом РФ 24.06.2003. Москва: Минздрав России; 2004.
11. Yorgancilar E., Deveci E., Deveci S. Effects of Formaldehyde on Respiratory Mucosa in Rats International. *Journal of Morphology*. 2012; 30 (2): 521-3.
12. Маснави́ева Л.Б., Кудaeва И.В., Рукавишников В.С. Оценка зависимости реакции миграции лейкоцитов от уровня ингаляционного воздействия приоритетных загрязнителей воздушно среды. *Анализ риска здоровью*. 2017; 3: 60-5.
13. Карпов А.А., Орешко Л.С., Пашинин А.Л., Цховребова З.М. Морфофункциональные особенности клеток назального секрета больных целиакией с хроническими заболеваниями верхних дыхательных путей. *Российская ринология*. 2018; 26 (1): 32-7.
14. Jeffrey W. Fisher, David C. Dorman, Michelle A. Medinsky, Frank Welsch. Conolly Analysis of Respiratory Exchange of Methanol in the Lung of the Monkey Using a Physiological Model Toxicological sciences. *Copyright 2000 by the Society of Toxicology*. 2000; 53: 185–93.

REFERENCES

1. Shapiro N.Ah. Cytological diagnosis of lung diseases. Color Atlas [Tsitologicheskaya diagnostika zabolevaniy legkikh]. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
2. Ryazantsev S. V., Khmel'nitsky N. Mmm. Tyrnova E. V. Pathophysiological mechanisms of chronic inflammatory diseases of the mucous membrane of the upper respiratory tract. *Vestnik otolaringologii*. 2001; 6: 56-9. (in Russian)
3. Appel'gans T. V., Chinaeva N., Makhov V. A., Kuzmin L. V. The Importance of morphological examination in the diagnosis of rhinosinusitis. *Vrach-aspirant*. 2006; 3: 208-13. (in Russian)
4. Barkhina T. G., Gusyev S. A., Gushchin M. Y., utesheva V. A., Chernikov V. P. Clinical-morphological characteristics of different forms of rhinitis. *Morfologicheskie vedomosti*. 2017; 2: 14-20. (in Russian)
5. Zhuravskaya N.S., Vitkina T. I., Krukovskaya E. A., Nastavsheva T. A. Method of smears from the nasal mucosa in the diagnosis of diseases of the respiratory system. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2002; 2: 40-2. (in Russian)
6. Zimina V. I., Ptitsina A. I., Sokolov I. I. The diagnostic value of the laboratory Research. Fundamental problems of science. Collected papers [Rinotsitogramma – diagnosticheskoe znachenie laboratornogo issledovaniya. Fundamental' nye problem nauki]. Ufa: Aerna; 2016. (in Russian)
7. Bova A. A., Gorokhov S. S. Military toxicology and toxicology of extreme situations. Minsk: Belorusskiy gosudarstvennyi meditsinskiy universitet; 2005.
8. Schlottmann U. Formaldehyde SIDS Initial Assessment Report For SIAM. Paris; 2002: 395.
9. Protasov N. S., Burmistrova T. V., Beilina E. V., Kaznacheeva E.I. Exfoliated analysis in the differential diagnosis of the ear, throat, nose. *Novosti klinicheskoy tsitologii Rossii*. 2013; 1-2: 54. (in Russian)
10. R 2.2.1766-03 Guidelines on occupational risk assessment for workers health. Organizational and methodological aspects, principles and criteria. 24.06.2003. Russian Federation Chief Public Health Officer. Moscow; 2004. (in Russian)
11. Yorgancilar E., Deveci E., Deveci S. Effects of Formaldehyde on Respiratory Mucosa in Rats International. *Journal of Morphology*. 2012; 30 (2): 521-3.
12. Manasieva L. B., Kudaeva I. V., Rukavishnikov V. S. The estimation of the dependence of the reaction of migration of leukocytes from the level of inhalation exposure to priority pollutants of the air environment. *Analiz riska zdorov'ju*. 2017; 3: 60-5. (in Russian)
13. Karpov A. A., Oreshko L. S., Pashinin A. L., Tskhovrebova Z. M. Morphological and functional features of cells in nasal secretions of patients with celiac disease with chronic respiratory diseases. *Rossiyskaya rinologiya*. 2018; 26 (1): 32-7. (in Russian)
14. Fisher J.W., Dorman D.C., Medinsky M.A., Welsch F. Conolly Analysis of Respiratory Exchange of Methanol in the Lung of the Monkey Using a Physiological Model Toxicological sciences. *Copyright 2000 by the Society of Toxicology*. 2000; 53: 185–93.

Поступила 30.09.18

Принята к печати 21.09.18

КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Потылицина В.В.¹, Самойленко В.В.⁴, Лобанова С.М.¹, Ольховский И.А.^{2,3}, Пальгова И.В.⁵

К ВОПРОСУ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ ФАКТОР-ПАРАЛЛЕЛИЗМА И ИНДЕКСА ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО АНТИКОАГУЛЯНТА В АЛГОРИТМЕ ДИАГНОСТИКИ ДЕФИЦИТА ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ

¹КГБУЗ Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства, 660074, Красноярск, Россия;

²Красноярский филиал ФГБУ «Национальный исследовательский медицинский центр гематологии» Минздрава РФ, 660036, Красноярск, Россия;

³ФГБУН Федеральный исследовательский центр Сибирского отделения Российской академии наук, 660036, Красноярск, Россия;

⁴ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, 129110, Москва, Россия;

⁵ЗАО «Фирма Гален», 109044, Москва, Россия

В работе представлен опыт сравнительного использования алгоритмов выявления причин дефицита факторов свертывания у пациентов с удлинением АЧТВ, включая определение индекса циркулирующего антикоагулянта (ИЦА) и метод фактор-параллелизма (ФП). Продемонстрированы результаты, полученные у детей с наследственной гемофилией и взрослых с приобретенной формой гемофилии. Показано, что ИЦА является эффективным методом предварительного отбора пациентов с наследственной формой гемофилии при подозрении на ингибитор для последующего подтверждения тестом Bethesda. Метод ФП зарекомендовал себя наилучшим образом при диагностике приобретенных форм гемофилии. Использование метода ФП наиболее целесообразно на этапе скрининга для выявления ингибиторов в условиях лаборатории. Метод ФП теряет диагностическое значение, если результаты активности фактора во всех разведениях близки к нулю, что характерно для отдельных вариантов наследственных гемофилий.

Ключевые слова: гемостаз; ингибиторная форма гемофилии; индекс циркулирующего антикоагулянта; фактор-параллелизм.

Для цитирования: Потылицина В.В., Самойленко В.В., Лобанова С.М., Ольховский И.А., Пальгова И.В. К вопросу использования методов фактор-параллелизма и индекса циркулирующего антикоагулянта в алгоритме диагностики дефицита факторов свертывания. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (2): 83-88. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-83-88>

Potylytsina V.V.¹, Samoilenko V.V.⁴, Lobanova S.M.¹, Olkhovskiy I.A.^{2,3}, Palgova I.V.⁵

THE ISSUE OF USE PARALLELISM FACTOR METHOD AND INDEX OF CIRCULATING ANTICOAGULANT IN DIAGNOSTIC ALGORITHM DEFICIENCY OF COAGULATION FACTORS

¹CGBOT Krasnoyarsk Regional Clinical Center of Maternity and Childhood, 660074, Krasnoyarsk, Russia;

²Krasnoyarsk Branch of FGBU "National Research Medical Center of Hematology" of the Ministry of Health of Russia, 660036, Krasnoyarsk, Russia;

³FGBUN Federal Research Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 660036, Krasnoyarsk, Russia;

⁴SBHI MR MONICA named M. Vladimirovsky, 129110, Moscow, Russia;

⁵CJS Company "Company Galen", 109044, Moscow, Russia

The paper presents the comparative use of algorithms to identify the causes of deficiency of coagulation factors in patients with a prolonged APTT, including the definition of the index of circulating anticoagulant (ICA) and the factor-parallelism (FP) method. The results obtained in children with hereditary hemophilia and adults with acquired hemophilia. It is shown that ICA is an effective method for pre-selection of patients with hereditary hemophilia if you suspect an inhibitor to subsequent confirmation test Bethesda. The method the FP has just proved itself in the diagnosis of acquired forms of hemophilia. The use of FP method is most expedient at the stage of screening to identify inhibitors in the laboratory. Method FP loses diagnostic value if the results of the activity factor in all dilutions is close to zero, which is characteristic for individual variants of hereditary hemophilia.

Key words: hemostasis; hemophilia; inhibitor of coagulation factors; factor-parallelism.

For correspondence: Potylytsina V.V., candidate of medical Sciences, head of the express laboratory KDL; e-mail: Gemostaz63@mail.ru

For citation: Potylytsina V., Samoilenko V., Lobanova S., Olkhovskiy I., Palgova I. The issue of use parallelism factor method and index of circulating anticoagulant in diagnostic algorithm deficiency of coagulation factors. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019;64 (2): (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-83-88>

Information about authors:

Potylytsina V. <https://orcid.org/0000-0002-3168-4105>

Samoilenko V. <https://orcid.org/0000-0001-9970-841X>

Lobanova S. <https://orcid.org/0000-0002-8753-1554>

Olkhovskiy I. <https://orcid.org/0000-0003-2311-2219>

Palgova I. <https://orcid.org/0000-0001-5655-0712>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support*

Received 14.02.2019
Accepted 24.02.2019

Введение. Протромбиновое время (ПВ) и активированное частичное тромбoplastиновое время (АЧТВ) — два наиболее часто используемых лабораторных теста для выявления дефицита факторов свертывания [1, 17]. Существенное влияние на результаты этих классических коагуляционных тестов оказывают аутоантитела - ингибиторы факторов свертывания. Ингибиторы могут быть специфическими, то есть направленными против конкретного фактора свертывания. В этом случае развивается ингибиторная форма гемофилии [2, 9, 13, 14]. Неспецифические ингибиторы — это, как правило, волчаночные антикоагулянты, которые блокируют фосфолипид-зависимые реакции свертывания *in vitro*, что удлиняет АЧТВ и ПВ и является фактором риска развития тромбозов и потери плода [7, 12, 18].

Только используя специально модифицированные тесты, можно отличить кровоточивость, связанную с истинным дефицитом факторов, от кровоточивости, связанную с возможным появлением ингибитора к факторам свертывания. Метод вычисления индекса циркулирующего антикоагулянта (ИЦА) основан на тесте АЧТВ с использованием люпус отрицательного контроля. Альтернативный метод фактор-параллелизм (ФП) основан на оценке уровня активности конкретного фактора свертывания в серии последовательных разведений плазмы пациента с пересчетом активности на степень разведения. Автоматизированный вариант метода ФП реализован в меню автоматического анализатора ACL TOP (Instrumentation Laboratory, США).

Появление ингибиторных антител к факторам свертывания крови является редкой патологией (0,2-1,0 случай на миллион обследуемых пациентов в год), но не редким осложнением гемостатической и профилактической терапии при наследственной гемофилии и составляет в среднем при гемофилии А 33%, а при гемофилии В 7,5% [4, 5, 15]. Ингибитор может появиться уже после 2-3 введений гемостатических препаратов. При возникновении ингибиторов на фоне лечения гемофилии коренным образом меняется схема лечения и резко возрастают финансовые затраты как на лечение, так и на лабораторное сопровождение больного с ингибитором [6, 10, 11, 16].

Редкая встречаемость приобретенной формы гемофилии и, как следствие, отсутствие настороженности в отношении этой жизнеугрожающей патологии (смертность составляет 10-22%), значительная отдаленность от специализированных гемостазиологических лабораторий зачастую делает невозможным или отсроченным выполнение специализиро-

ванных методов диагностики ингибиторной формы гемофилии.

Методом «золотого стандарта» для специфической количественной оценки титра ингибитора признан метод Bethesda в модификации Nijmegen [3, 9]. Вместе с тем, этот метод является весьма трудоемким и дорогостоящим, выполняется только в специализированных лабораториях, поэтому актуальным является поиск менее затратных методов диагностики ингибиторной формы гемофилии.

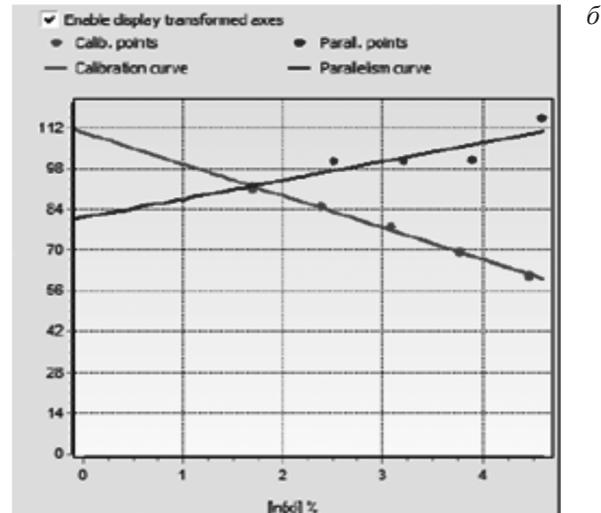
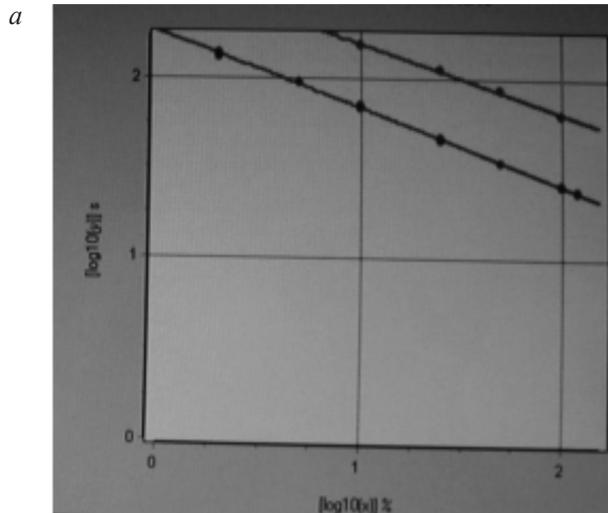
Целью настоящей работы явилась оценка двухэтапного алгоритма диагностики ингибиторных форм гемофилии. На первом этапе мы использовали методы вычисления ИЦА и значения ФП. На втором этапе пробы, потенциально содержащие ингибитор, тестировались методом Bethesda.

Материал и методы. В работе обследовано 47 детей с гемофилией, из них 32 ребенка с гемофилией А и 15 детей с гемофилией В. Десять детей обследованы дву- и трехкратно. Всем детям перед исследованием системы свертывания крови концентраты факторов не вводились в течение 48-72 часов. Также были обследованы 2 пациента с приобретенной гемофилией.

Всем пациентам выполнялась классическая коагулограмма, включающая тесты: АЧТВ, протромбиновую активность по Квику, концентрацию фибриногена и тромбиновое время. При удлиненном тесте АЧТВ проводился тест смешивания с люпус отрицательной плазмой, после 2-часовой инкубации вычислялся ИЦА, также определялась активность дефицитного фактора и проводилась методика ФП. Для части пациентов проводили тест по Bethesda. Все исследования осуществлялись на анализаторе ACL TOP 700 (500) с использованием реагентов Instrumentation Laboratory.

Методика подсчета ИЦА включает определение АЧТВ (ПВ) в тесте смешивания плазмы больного с нормальной плазмой. Значения ИЦА более 15% свидетельствуют в пользу наличия ингибитора [8, 12].

Теория использования метода ФП для исключения наличия ингибитора в плазме изложена в статье P. Mannucci, A. Tripodi еще в 1999 г. [17]. В автоматизированном режиме метод ФП реализован в меню анализаторов ACL Elite Pro и ACL TOP (Instrumentation Laboratory, США), но может быть выполнен в ручном режиме с использованием доступных статистических программ. При выполнении методики ФП анализатор ACL TOP автоматически делает серию разведений и определяет активность искомого фактора в каждом разведении. На основании полученных результатов строится график, аналогичный ка-



Графики фактор-параллелизма.

а – графики параллельны, ингибитор отсутствует; б – графики пересекаются, вероятность ингибитора велика.

либровочному, где в качестве калибратора выступает плазма больного. Затем полученный график сравнивается с реальным калибровочным. Оба графика выводятся на дисплее анализатора для визуального сравнения.

При отсутствии ингибитора график разведения плазмы пациента аналогичен калибровочному. На экране можно видеть 2 параллельные линии – калибровочная и на основе плазмы пациента (см. рисунок, а).

Если в образце присутствует ингибитор, то при разведении образца происходит снижение концентрации ингибитора, и его ингибирующие свойства ослабевают, в результате чего активность фактора возрастает. В таком случае можно видеть 2 пересекающихся графика (см. рисунок, б).

Полученные результаты оценивают по критериям параллелизма.

Визуальная оценка. Если графики калибратора и образца направлены в разные стороны или пересекаются – это 1 балл в пользу наличия ингибитора.

Сравнение значений наклонов данных. Если наклон графика образца отличается больше чем на 20% от наклона графика калибратора – это 0,5 балла в пользу наличия ингибитора.

Значение параметра R^2 . Если при построении графика образца точки далеко отстоят от линии графика, то параметр R^2 будет меньше 0,97, и это 0,5 балла в пользу наличия ингибитора.

Подсчет значений активности фактора, скорректированный на процент разведения. Если активность возрастает или значения разнонаправлены – это 1 балл в пользу наличия ингибитора.

Коэффициент вариации между скорректированными результатами. Если коэффициент вариации больше 20% - это 1 балл в пользу наличия ингибитора.

Если сумма баллов больше или равна 2,5 – вероятность ингибитора расценивалась, как высокая.

Результаты. Сравнение алгоритмов диагностики при ингибиторной гемофилии.

Когорта пациентов, попавших в данное исследование, по результатам тестирования предлагаемым алгоритмом разделилась на следующие группы:

В первой группе в 32 случаях из 47 при проведении диагностики гемофилии результаты метода Bethesda, ИЦА и ФП совпали и свидетельствовали о наличии гемофилии без ингибитора: отрицательный результат метода Bethesda (0 BU/ml), ИЦА менее 15%, сумма баллов по критериям ФП менее 2.

Во второй группе у 8 пациентов из 47 были получены противоречивые результаты: сумма баллов по критериям ФП была более 2,5, что свидетельствовало в пользу наличия ингибитора, а уровень ИЦА был менее 15%. Результаты теста Bethesda исключали наличие ингибитора. Результаты теста ФП, свидетельствующие о наличии ингибитора, мы связываем с, возможно, избыточной чувствительностью методики ФП.

В третьей группе у 4 пациентов из 47 уровень ИЦА в 2-4 раза превышал пограничное значение. Активность ингибитора к фактору VIII по Bethesda была от 2,25 до 96 BU/ml. При этом сумма баллов по критериям ФП была пограничной, то есть равна 2,5, что не позволяло нам сделать однозначный вывод о наличии или отсутствии ингибитора. Стоит отметить, что у всех пациентов этой группы скорректированный на степень разведения уровень фактора VIII был экстремально низкий, менее 1%.

В четвертую группу попали 3 из 47 случаев, где уровень ИЦА и сумма баллов по критериям ФП свидетельствовали в пользу наличия ингибитора. Результаты теста Bethesda также выявляли активность ингибитора.

Пример № 1 из четвертой группы. «Гемофилия А. Ингибиторная форма».

Ребенку С. диагноз впервые выставлен на первом месяце жизни. Был выражен геморрагический синдром (кровотечения из десен, слизистых, гематомы). С 6 мес получал профилактику концентратом факто-

Таблица 1

Показатели плазменного гемостаза у ребенка с гемофилией А

Критерии	Протромбиновая активность, %	Фибриноген, г/л	АЧТВ, с Отношение	Тромбиновое время, с	ИЦА, %	Баллы ФП	Фактор VIII, %	Ингибитор по Bethesda, BU/ml
	88	2.65	93.0 2.99	22.0	65	4,0	0.3	18.96
Референсные значения	80-140	2.0-3,93	26.4-37.8 ; <1,2	15.8-24.9	<15	< 2,5	70-150	<0.6

Таблица 2

Скорректированные на процент разведения результаты активности фактора VIII у ребенка с гемофилией А

Концентрация (разведение)	100%	50%	25%	12.5%
Скорректированный результат по ФП	0.3%	1.1%	2.0%	2.4%

Таблица 3

Результаты теста ФП, подсчёт баллов

Критерии	Визуальная оценка графиков	Сравнение значения наклона графика, %	R ²	Скорректированные на процент разведения результаты	CV % скорректированных результатов
Результат	Пересекаются	> 20	0,94	Возрастают	126,9
Референсное значение	Параллельны	< 20	> 0,97	Не возрастают, не разнонаправлены	< 20
Баллы	1	0,5	0,5	1	1

Таблица 4

Показатели плазменного гемостаза у пациентки Д.

Критерии	Протромбиновая активность, %	Фибриноген, г/л	АЧТВ, с	Тромбиновое время, с	ИЦА, %	Фактор Виллебранда, активность, %	Волчаночный антикоагулянт (НО)	Антитромбин, %
Результат	116	4,0	88	21	50	169	1.29	130
Референсные значения	80-140	2.0-3,93	26.4-37,8	15.8-24,9	<15	42-141	≤ 1.2	83-123

Таблица 5

Результаты активности факторов свертывания у пациентки Д.

	Активность факторов, %						Баллы ФП		Ингибитор по Bethesda, BU/ml	
	VII	VIII	IX	XI	XII	XIII	VIII	IX	VIII	IX
Результат	136	5,4	10,3	не определяется	9	75	4,0	4,0	576	8
Референсные интервалы	50-129	50-160	65-150	65-150	50-150	75-155	< 2,5		<0.6	

Таблица 6

Скорректированные на процент разведения результаты активности фактора VIII и IX у пациентки Д. (в %)

Концентрация (разведение)	100	50	25	12.5
Скорректированный результат по ФП VIII фактор	5.4	10.9	12.2	не выполнялось
Скорректированный результат по ФП IX фактор	10.3	22.2	48.7	не выполнялось

Результаты теста ФП, подсчёт баллов

Критерий	Визуальная оценка графиков	Сравнение значения наклона графика, %	R ²	Скорректированные на процент разведения результаты	CV % скорректированных результатов
Результат VIII фактор	Пересекаются	0	0,617	Возрастают	65
Баллы VIII фактор	1	0	0,5	1	1
Результат IX фактор	Пересекаются	0,2	0,689	Возрастают	128
Баллы IX фактор	1	0	0,5	1	1
Референсное значение	Параллельны	< 20	> 0,97	Не возрастают, не разнонаправлены	< 20

ра VIII в дозе 25-30 ЕД/кг. В 2 года выявлен ингибитор к фактору VIII, активность 7,2 BU/ml. Клинически кровотечения, гемартрозы 4-5 раз в год. В 4 года активность ингибитора возросла до 44 BU/ml. С сентября 2012 г. получал профилактику ФЕЙБА по 500 ЕД 3 раза в неделю, ингибитор снижался до 6 BU/ml. Клинически наблюдается геморрагический синдром в виде спонтанных гематом. Результаты обследования представлены в табл. 1, 2 и 3. Наблюдается высокий уровень ИЦА, сумма баллов по критериям ФП выше пороговой. Скорректированные результаты в тесте ФП возрастали с разведением. Данные всех лабораторных тестов свидетельствовали в пользу ингибитора.

Пример № 2. Приобретенная гемофилия, ингибиторная форма.

Большая Д., 1955 г.р., поступила в КДО МОНИКИ в мае 2012 г. с жалобами на обширные кровоизлияния в области конечностей, которыми страдала с декабря 2011 г. Результаты обследования представлены в табл. 4,5,6,7. Лабораторные исследования плазменного гемостаза выявили высокий уровень ИЦА, экстремально низкую активность факторов VIII, IX, XI и XII. Активность факторов VII и XIII была в норме. Сумма баллов ФП для факторов VIII и IX была выше пороговой. Скорректированные результаты в тесте ФП для VIII и IX факторов возрастали с разведением. Результаты тестов на агрегацию тромбоцитов были в норме. На базе ГНЦ г. Москвы были выполнены тесты Bethesda на определение активности ингибиторов к VIII и IX фактору. Оба теста были положительными. Пациентке был поставлен диагноз: «Приобретенная гемофилия». Пациентка получила иммуносупрессивную (преднизолон) и гемостатическую терапию препаратом «эптаког альфа» с хорошим эффектом.

Обсуждение. Таким образом, результаты теста ИЦА согласовались с результатами теста «золотого стандарта» Bethesda. Используемое пороговое значение ИЦА 15% не потребовало корректировки. Однако, абсолютные значения теста ИЦА не показали линейной зависимости с получаемыми значениями активности ингибитора в тесте Bethesda. Кроме того, в случаях неизвестной причины кровотечения (приобретенная ингибиторная гемофилия) результаты теста ИЦА не позволяют определить, к

какому именно фактору выработался ингибитор. В этих случаях более детальную информацию можно было бы получить при расчете ФП отдельно для факторов.

Вместе с тем, в нашем исследовании мы наблюдали частое расхождение результатов расчета ФП с результатами теста Bethesda, что вероятнее всего связано с необходимостью корректировки критериев ФП на основании собственных статистических данных. В своей работе мы использовали критерии оценки параллелизма, рекомендованные производителем.

Кроме того, использование ФП ограничено экстремально низким исходным уровнем активности факторов (или полным отсутствием их нормального синтеза), что не редко бывает при наследственных формах гемофилии и практически никогда – при приобретенных вариантах. Метод ФП может иметь перспективны использования в качестве теста предварительного отбора перед тестом Bethesda, если есть уверенность в том, что исходная активность фактора достаточна для проявления его активности в серии последовательных разведений.

Выводы

1. Алгоритм выявления эндогенных ингибиторов к факторам свертывания VIII или IX целесообразно разделить на два этапа: на первом этапе, доступном в любой клинико-диагностической лаборатории, следует использовать скрининговые тесты: ИЦА или метод ФП, а на втором этапе пробы с подозрением на наличие ингибитора следует тестировать подтверждающим количественным методом Bethesda в специализированной лаборатории гемостаза.

2. При подозрении на ингибиторную форму наследственной гемофилии на первом этапе тестирования целесообразно использовать расчет индекса циркулирующего антикоагулянта (ИЦА), так как известен фактор-мишень.

3. При подозрении на ингибиторную форму приобретенной гемофилии в качестве теста выбора на первом этапе тестирования может быть рекомендован метод ФП, так как не известен фактор-мишень.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4-6, 8-9, 12, 14-16, 18
см. REFERENCES)

1. Баркаган З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Москва: Ньюдиамед; 2002.
3. Мамаев Н.Н., Рябов С.И. Гематология: руководство для врачей. Санкт-Петербург: СпецЛит; 2008.
7. Воробьев А.И., ред. Руководство по гематологии. Москва: Медицина; 2005.
10. Кузник Б.И., Максимова О.Г. Клиническая гематология детского возраста: учебное пособие. Москва: Вузовская книга; 2010.
11. Кузник Б.И., Стуров В.Г., Максимова О.Г. Геморрагические и тромботические заболевания и синдромы у детей. Новосибирск: Наука; 2012.
13. Национальные стандарты Российской Федерации. Протоколы ведения больных: болезнь Виллебранда (ГОСТ Р 52600.1-2008), гемофилия (ГОСТ Р 52600.3-2008). Москва: СТАНДАРТИН-ФОРМ, 2008: 81-197.
17. Долгов В.В., Свиринов П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. Москва-Тверь: Триада; 2005.

REFERENCES

1. Barkagan Z.S. Diagnosis and therapy controlled hemostasis disorders. Moscow: N'judiamed; 2002. (in Russian)
2. Mannucci P.M., Tripoli A. Factor VIII Clotting Activity. Laboratory techniques in Thrombosis. In: A manual 2-nd revised edition of ECAT Assay Procedures. 1999: 107-113.
3. Mamaev N.N., Rjabov S.I. Hematology: A Guide for Physicians. St.Petersburg: SpetsLit; 2008. (in Russian)
4. Patiroglu T., Ozdemir M.A., Unal E., Torun Y.A., Coskun A., Menku A. et al. Intracranial hemorrhage in children with congenital factor deficiencies. *Childs. Nerv. Syst.* 2011; 11: 1963-6.
5. Kershaw G., Favaloro E.J. Laboratory identification of factor inhibitors: an update. *Pathology.* 2012; 44: 293-302.
6. Doma S.A., Hillarp A., Pajic T., Andoljsek D., Cemec P., Zupan I.P. Concurrent acquired inhibitors to factor VIII and IX, a laboratory artifact: a case report. *Biochemia Medica.* 2016; 26(2): 279-84.
7. Vorob'ev A.I., ed. Guide to Hematology [Rukovodstvo po gematologii]. Moscow: Meditsina; 2005; 3. (in Russian)
8. Kumano O., Leko M., Naito S., Yoshida M., Takahashi N., Suzuki T. et al. Verification of the guidelines for lupus anticoagulant detection:

Usefulness of index for circulating anticoagulant in APTT mixing test. *Thrombosis Research.* 2014; 134: 503-9.

9. Ruinemens-Koerts J., Peterse-Stienissen I., Verbruggen B. Non-parallelism in the one-stage coagulation factor assay is a phenomenon of lupus anticoagulants and not of individual factor inhibitors. *Thrombosis and Haemostasis.* 2010; 104(5): 1080-2.
10. Kuznik B.I., Maksimova O.G. Clinical hematology childhood: a tutorial [Klinicheskaya gematologiya detskogo vozrasta]. Moscow: Vuzovskaya kniga; 2010. (in Russian)
11. Kuznik B.I., Sturov V.G., Maksimova O.G. Hemorrhagic and thrombotic diseases and syndromes in children [Gemorragicheskie i tromboticheskie zabolevaniya i sindromy u detey]. Novosibirsk: Nauka, 2012. (in Russian)
12. Collins P.W., Chalmers E., Hart D., Jennings I., Liesner R., Ranagarajan S., et al. United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization. Diagnosis and management of acquired coagulation inhibitors: a guideline from UKHCDO. *Br. J. Haematol.* 2013; 162: 758-73.
13. National standards of the Russian Federation. Treatment Protocol: von Willebrand disease (GOST R 52600.1-2008), Hemophilia (GOST R 52600.3-2008). Moscow: Standartinform, 2008:181-97. (in Russian)
14. Perry D., Berntorp E., Tait C., Dolan G., Holme P.A. FEIBA prophylaxis in haemophilia patients: a clinical update and treatment recommendations. *Haemophilia.* 2010; 16 (1): 80-9.
15. Valentino L.A., Perry D. Assessing the benefits of FEIBA prophylaxis in haemophilia patient Aydogan its with inhibitors. *Haemophilia.* 2010; 16 (2): 263-71.
16. Coppola A., Favaloro E.J., Tufano A., Di Minno M.N., Cerbone A.M., Franchini M. Acquired inhibitors of coagulation factors: part I acquired hemophilia A. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis.* 2012; 38: 433-46.
17. Dolgov V.V., Svirin P.V. Laboratory diagnosis of hemostatic disorders. Moscow – Tver': Triada; 2005. (in Russian)
18. Tripodi A., Biasiolo A., Chantarangkul V., Pengo V. Lupus Anticoagulant (LA) Testing: Performance of Clinical Laboratories Assessed by a National Survey Using Lyophilized Affinity-purified Immunoglobulin with LA Activity. *J. Clinical Chemistry.* 2003; 49:10, 1608-14.

Поступила 14.02.2019

Принята к печати 24.02.2019

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Смирнова А.В.^{1,2}, Борзова Н.Ю.², Сотникова Н.Ю.^{1,2}, Малышкина А.И.^{1,2}, Бойко Е.Л.²

МЕТОД ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПЕРИНАТАЛЬНЫХ ГИПОКСИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ У НОВОРОЖДЕННЫХ

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

²ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н.Городкова» Минздрава РФ, 153045, Иваново, Россия

Перинатальные поражения центральной нервной системы у новорожденных занимают ведущее место в структуре перинатальной заболеваемости и последующей инвалидизации детей. Цель: выявить особенности содержания sRAGE у беременных с угрожающими преждевременными родами в сроке 22-27 нед, родивших впоследствии детей с перинатальным поражением ЦНС. В сыворотке венозной крови беременных с УПР в сроке 22-27 нед методом ИФА однократно определялось содержание sRAGE. При значении sRAGE у беременных равном 659,5 пг/мл или менее прогнозируют перинатальные гипоксические поражения центральной нервной системы у новорожденных с точностью 75,8% (чувствительность 82,6%, специфичность 66,7%).

Ключевые слова: перинатальные поражения центральной нервной системы; угрожающие преждевременные роды; sRAGE.

Для цитирования: Смирнова А.В., Борзова Н.Ю., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И., Бойко Е.Л. Метод прогнозирования перинатальных гипоксических поражений центральной нервной системы у новорожденных. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64 (2): 89-93. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-89-93>

Smirnova A.^{1,2}, N. Borzova^{1,2}, N.Sotnikova^{1,2}, A.Malyshkina^{2,1}, E.Bojko²

METHOD FOR PREDICTING PERINATAL HYPOXIC LESIONS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN NEWBORNS

¹ Federal State Budgetary Institution "Research Institute of Maternity and Childhood named by V.N. Gorodkov" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo, Russia;

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ivanovo State Medical Academy" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo, Russia

Perinatal lesions of the Central nervous system (CNS) in newborns occupy a leading place in the structure of perinatal morbidity and subsequent disability of children. To identify the features of the content of sRAGE in pregnant women with threatening preterm labor (UPR) in the period of 22-27 weeks, who subsequently gave birth to children with perinatal CNS lesion. Serum of venous blood of pregnant women with UPR at the term of 22-27 weeks was determined by ELISA once the content of sRAGE. If the value of sRAGE in pregnant women is 659.5 PG/ml or less, perinatal hypoxic lesions of the Central nervous system in newborns are predicted with an accuracy of 75.8% (sensitivity of 82.6%, specificity of 66.7%).

Key words: perinatal lesions of the Central nervous system; threatening preterm labor; sRAGE.

For citation: Smirnova A., Borzova N., Sotnikova N., Malyshkina A., Bojko E. Method for predicting perinatal hypoxic lesions of the central nervous system in newborns. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (2): 89-93 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-89-93>

For correspondence: Smirnova A.V., candidate of medical Sciences, assistant of the department of obstetrics and gynecology, medical genetics ; e-mail: anguseva@yandex.ru

Information about authors:

Smirnova A. <https://orcid.org/0000-0002-6811-6830>

Borzova N. <https://orcid.org/0000-0002-2247-3963>

Sotnikova N. <https://orcid.org/0000-0002-0608-0692>

Malyshkina A. <https://orcid.org/0000-0002-1145-0563>

Bojko E. <https://orcid.org/0000-0002-8907-4860>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 18.01.2019

Accepted 24.01.2019

Для корреспонденции: Смирнова Анастасия Владимировна, канд. мед. наук, ассистент каф. акушерства и гинекологии, мед. генетики; e-mail: anguseva@yandex.ru

Введение. Перинатальные поражения центральной нервной системы (ЦНС) занимают ведущее место в структуре перинатальной заболеваемости и смертности, поэтому их прогнозирование, ранняя диагностика и лечение являются ключевыми задачами

на пути снижения неблагоприятных перинатальных исходов. По данным эпидемиологических исследований частота постановки диагноза «перинатальное поражение центральной нервной системы» достигает 715:1000 детей первого года жизни. Успехи последних лет в выхаживании недоношенных и преодолении фатальных осложнений острой и хронической внутриутробной гипоксии плода в части случаев имеют следствием увеличение встречаемости стойких неврологических расстройств. Таким образом, гипоксически-ишемическое поражение мозга в перинатальном периоде продолжает являться одной из основных причин смертности новорожденных, так и развития тяжелой патологии ЦНС с исходом в инвалидизацию [1].

Среди причин перинатальных поражений мозга ведущее место занимает внутриутробная и интранатальная гипоксия плода, второе по значимости место принадлежит фактору механической травматизации ребенка в процессе родов – как правило, в сочетании с той или иной степенью выраженности, предшествующей внутриутробной гипоксии [2,3].

Преждевременные роды значительно увеличивают вероятность перинатальных поражений центральной нервной системы у новорожденного [3,4]. Тяжесть осложнений, связанных с недоношенностью, пропорциональна гестационному сроку преждевременных родов. Сроки гестации 22-27 нед наиболее уязвимы для состояния новорожденных и являются важнейшими в формировании структур головного мозга. Поэтому прогнозирование перинатальных гипоксических поражений центральной нервной системы у пациенток с угрожающими преждевременными родами в сроки 22-27 нед является актуальным и помогает своевременно выявлять группы риска по развитию данной патологии, корректировать тактику лечения и выбрать способ родоразрешения.

Иммунные механизмы играют одну из ключевых ролей в стимулировании преждевременной родовой деятельности [5-11]. В последние годы большое внимание исследователей привлекает изучение значения рецептора для конечных продуктов гликозилирования (receptor for advanced glycation end products - RAGE) и его лигандов в патогенезе различных осложнений гестации и патологии новорожденного [12-14]. RAGE – это мультилигандовый поверхностный клеточный рецептор, представитель суперсемейства иммуноглобулинов. Помимо связанного с мембраной RAGE (fl-RAGE), RAGE присутствует и в растворимой форме, которая не имеет трансмембранных и цитоплазматических доменов – sRAGE (soluble RAGE) и образуется посредством протеолитического расщепления fl-RAGE и альтернативного сплайсинга мРНК [15]. Увеличение протеолитического распада приводит к повышению уровня sRAGE, торможение – наоборот. Регулируется этот процесс уровнем ионов кальция. Высокая экспрессия RAGE ассоциирована с множеством заболеваний, ведущими в патогенезе которых являются хронический стресс, воспаление или некроз (сосудистые заболевания, рак, нейродегенерация и диабет) [16-18].

Материал и методы. Исследование является ко-

гортным проспективным нерандомизированным. Работа выполнена на базе ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России. Беременные женщины обследовались однократно в сроки гестации 22-27 недель. У всех 52 женщин был прослежен исход беременности и оценено состояние здоровья новорожденных. Все обследуемые женщины заполняли добровольное информированное согласие на участие в исследовании, методы исследования одобрены этическим комитетом при ФГБУ «Ивановский НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России.

Критериями включения женщин в основную группу являлись наличие клинических признаков угрожающих преждевременных родов при беременности 22-27 нед, а именно регулярные схваткообразные боли внизу живота, сопровождающиеся структурными изменениями шейки матки при целом плодном пузыре. В исследование не были включены беременные с тяжелой экстрагенитальной патологией (артериальная гипертензия свыше 2 степени, сердечная недостаточность, ожирение 3 и 4 степени, печеночная и почечная недостаточность, сахарный диабет). Критериями исключения также стали многоплодная беременность, врожденные пороки развития плода, индуцированные преждевременные роды, острые инфекционные заболевания на момент обследования, другие установленные осложнения данной беременности.

В зависимости от состояния новорожденного ретроспективно, были сформированы 2 группы исследования.

В работе использовались общепринятые клинико-лабораторные, функциональные (ультразвуковое исследование проводилось на приборе ультразвуковой диагностики SSD-200 фирмы «Aloka» (Япония), кардиотомография на аппарате Sonicaid Oxford с компьютерным анализом по критериям Dawes/Redman) методы исследования. В сыворотке периферической венозной крови методом иммуноферментного анализа (ИФА) на микропланшетном ридере Multiscan EX Labsystems (Финляндия) определяли содержание sRAGE осуществляли при помощи коммерческого набора Quantikine R&D Systems, USA.

Математическая обработка результатов исследования проводилась после проверки рядов данных на нормальность распределения. В зависимости от типа распределения данных достоверность различий между показателями независимых выборок оценивались по непараметрическому критерию U (Манна-Уитни) или по t-критерию. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05. Статистический анализ осуществлялся в пакете прикладных лицензионных программ «MicrosoftOffice 2007», «GenStat», «MedCalc».

Результаты. Возраст обследованных беременных колебался от 18 до 40 лет. Средний возраст женщин составил $26,57 \pm 0,54$ лет. Большинство женщин проживали в городе - 83,75%. В структуре соматической патологии во всех сравниваемых группах преобладали указания в анамнезе на инфекционные заболевания детского возраста (корь, краснуха,

скарлатина, ветряная оспа) и острые респираторно-вирусные инфекции. Из наблюдаемых 52 женщин у 36 произошли своевременные роды, 16 женщин родили преждевременно в сроки от 27 до 36 недель. На момент проведения исследования из 52 новорожденных 18 оказались без какой-либо перинатальной патологии, у 24 (8 из них были доношенными, 16 – недоношенными) диагностировано перинатальное поражение ЦНС различной степени тяжести, еще 11 новорожденных имели иную перинатальную патологию (желтуху, внутриутробную инфекцию и др.) без поражения ЦНС.

При анализе сывороточного уровня sRAGE у беременных с УПР 22-27 нед нами было отмечено его достоверное снижение у женщин, родивших детей с перинатальными гипоксическими поражениями ЦНС, по сравнению с беременными с угрожающими преждевременными родами в 22-27 нед, родившими практически здоровых детей ($519,62 \pm 50,67$ пг/мл и $746,44 \pm 48,56$ пг/мл соответственно, $p < 0,01$). На основании полученных данных нами был разработан способ прогнозирования перинатальных поражений ЦНС у новорожденных, у матерей которых была угроза прерывания беременности в 22-27 нед гестации [19].

Способ осуществляется по стандартной методике следующим образом.

1. У женщины с угрожающими преждевременными родами в сроки гестации 22-27 нед производят забор 1 мл периферической венозной крови.

2. Кровь центрифугируют 5 мин при 1500 оборотах в мин, для исследования отбирают 200 мкл отцентрифугированной сыворотки.

3. Количественное определение sRAGE человека в образцах сыворотки крови проводят методом твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с методическими рекомендациями фирмы-производителя, используемой тест-системы (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, США).

4. Результат анализа вычисляют по калибровочному графику после измерения оптической плотности и считают в пкг/л.

Отличительными признаками заявленного способа являются: установлен новый прогностический пара-

метр содержания sRAGE в периферической венозной крови женщины с угрожающими преждевременными родами в сроки гестации 22-27 нед, при количественном значении которого, равном 659,5 пкг/л или менее, прогнозируют развитие перинатальных поражений ЦНС.

Преимущества заявляемого способа:

1. Исследование проводится в достаточно ранние сроки 22-27 нед, что позволяет своевременно сформировать группы риска по развитию данной патологии, провести профилактические мероприятия и выбрать способ родоразрешения.

2. Способ распространяется как на доношенных, так и на недоношенных детей.

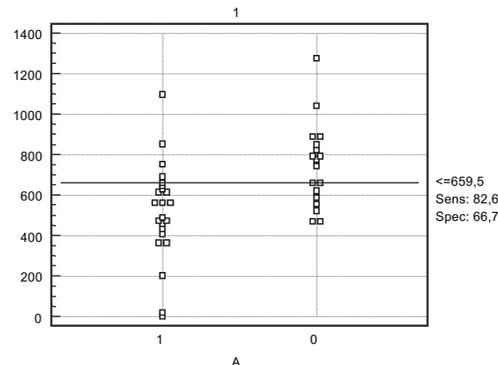
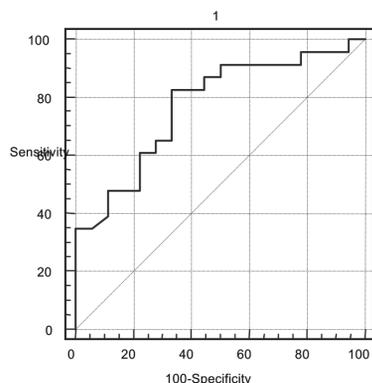
3. Способ позволяет прогнозировать перинатальные поражения ЦНС у новорожденных от матерей с угрожающими преждевременными родами.

Для прогнозирования перинатальных гипоксических поражений центральной нервной системы у новорожденных проводят определение содержания sRAGE в периферической венозной крови беременной с угрожающими преждевременными родами в сроки гестации 22-27 недель. При его значении равном 659,5 пг/мл или менее прогнозируют перинатальные гипоксические поражения центральной нервной системы у новорожденных. Данные ROC-анализа представлены на рисунке. Слева на рисунке отражены чувствительность (ось ординат) и специфичность (ось абсцисс), справа отображены в первом столбике случаи рождения детей с перинатальным поражением ЦНС, во втором столбике – рождение практически здоровых детей.

Заявленный способ прост в исполнении и позволяет прогнозировать перинатальные гипоксические поражения ЦНС в наиболее уязвимые для состояния плода и новорожденного сроки гестации 22-27 нед с точностью 75,8% [20].

Обсуждение. В мировой литературе имеется не так много данных об особенностях содержания RAGE и его лигандов при различных осложнениях гестации и патологии новорожденных [21-28].

Сообщается о снижении уровня sRAGE в сыворотке венозной крови у женщин с преждевременными



ROC-анализ показателя sRAGE в зависимости от наличия перинатального поражения ЦНС у новорожденного.

ми родами по сравнению со здоровыми беременными [18]. Однако другие исследования указывают на то, что при угрожающих преждевременных родах в сроках 24-34 нед гестации происходит повышение sRAGE по сравнению с неосложненной беременностью [16]. В работе Costatine M. et al. [28] сообщается о снижении sRAGE в пуповинной крови детей, рожденных у матерей с высоким риском перинатальной патологии с родами в сроки 24-31 недели гестации, у которых впоследствии развился детский церебральный паралич или произошла смерть в течение первого года жизни. В исследованиях С. Buhimisch и соавт. [16] показано снижение sRAGE в пуповинной крови детей, рожденных от матерей с угрожающими преждевременными родами (в том числе и с преждевременным разрывом плодных оболочек) с диагностированной внутриамниотической инфекцией при амниоцентезе в сроки гестации 23-37 недель. В работе Н.У. Лу [22] сообщается о снижении sRAGE в пуповинной крови у детей с тяжелым поражением ЦНС, родившихся в сроке до 34 нед гестации. Также имеются данные о повышении одного из лигандов RAGE белка HMGB1 у женщин с хориоамнионитом и преждевременными родами [27] и снижении sRAGE у новорожденных с сепсисом [24].

Как известно, угроза прерывания беременности приводит к увеличению проницаемости маточно-плацентарного барьера. Возможно, sRAGE, относясь к суперсемейству иммуноглобулинов и имея структурное сходство с молекулами антител, способен проникать через плацентарный барьер, накапливаясь в поврежденной ткани центральной нервной системы плода. Кроме того, мы не исключаем вероятность генетической неполноценности системы AGE's – RAGE вследствие генетического полиморфизма и возможности альтернативного сплайсинга мРНК RAGE. Работы, посвященные зависимости концентрации sRAGE и наличия тех или иных аллелей генов, подтверждают нашу гипотезу [21].

Мы считаем, что при развитии угрозы прерывания беременности, происходит повреждение и гипоксия тканей как материнского организма, так и плода, что вызывает высвобождение DAMPs (damaged-associated molecular pattern molecules) и накопление конечных продуктов гликозилирования (AGE's). Связывание DAMPs с лигандами RAGE приводит к активации ядерного фактора NF-κB и выбросу провоспалительных цитокинов и еще большему развитию повреждений. Главным образом, RAGE синтезируется на нейронах головного мозга, глии, скелетных мышцах, клетках иммунной системы. Известно, что растворимая форма RAGE, являясь его структурным аналогом, также связывает DAMPs и AGE's, но не приводит к активации NF-κB, а наоборот инактивирует их [15].

Мы полагаем, что вследствие длительной ишемии происходит перераспределение sRAGE в область очагов повреждения, а именно в нервную систему и центральные органы иммунной системы, что согласуется с данными исследования С. Buhimisch [16] на мышечной модели преждевременных родов и внутриматочного воспаления.

Таким образом, заявленный способ можно использовать в практической работе врачей акушеров-гинекологов и неонатологов для прогноза перинатальных гипоксических поражений центральной нервной системы у новорожденных, что позволяет на ранних этапах (уже в 22-27 нед беременности) выбрать правильную тактику лечения беременных и метод родоразрешения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 17-21, 23-32
см. REFERENCES)

1. Блинов Д.В. Общность ряда нейробиологических процессов при расстройствах деятельности ЦНС. *Эпилепсия и пароксизмальные состояния*. 2011; 2: 28-33.
2. Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Газиева И.А., Тарасова М.Н. Цитокинный статус новорожденных с перинатальным поражением ЦНС *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2012; 4 (41): 182-3.
3. Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. *Невынашивание беременности: Руководство для практикующих врачей*. М.: ООО «Медицинское информационное агентство»; 2010.
4. Кулаков В.И., ред. *Клинические рекомендации. Акушерство и гинекология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017.
5. Макаров О.В., Ганковская Л.В., Бахарева И.В., Кузнецов П.А., Карташов Д.Д. Современные методы лечения при преждевременных родах. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2009; 2: 29-34.
6. Ширшев С.В. *Механизмы иммунно-эндокринного контроля процессов репродукции*. Екатеринбург: Уральское отделение РАН; 2002.
7. Сотникова Н.Ю., ред. *Иммунологическая загадка беременности*. Иваново: МИК; 2005.
8. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. *Цитокины*. СПб: ООО «Издательство Фолиант»; 2008.
9. Иваненкова Н.И., Борзова Н.Ю., Сотникова Н.Ю. Дифференцировка периферических Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов у женщин с привычным невынашиванием в зависимости от исхода беременности. *Медицинская иммунология*. 2015; 17: 267.
10. Колобова А.В., Сотникова Н.Ю., Борзова Н.Ю. Содержание растворимой формы рецептора для конечных продуктов гликозилирования и белка S100B при невынашивании беременности в поздние сроки. *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2012; 41 (4): 122-3.
11. Володин Н.Н., Румянцев А.Г., Владимирская Е.Б., Дегтярева М.В. Цитокины и преждевременные роды. *Педиатрия*. 2001; 4: 72-6.
12. Колобова А.В., Сотникова Н.Ю., Борзова Н.Ю. Содержание sRAGE и белка S100B при угрожающих преждевременных родах 22-27 недель. *Российский иммунологический журнал*. 2013; 7 (2-3): 313.
13. Смирнова А.В., Борзова Н.Ю., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И. Особенности содержания растворимой формы рецептора для конечных продуктов гликозилирования при очень ранних угрожающих преждевременных *Акушерство и гинекология*. 2017; 10: 35-9.
14. Борзова Н.Ю., Сотникова Н.Ю., Колобова А.В. Способ прогнозирования перинатальных гипоксических поражений центральной нервной системы у новорожденных. Патент РФ № 2542463 МПК G 01N33/53; 2013.

REFERENCES

1. Blinov D.V. Commonality of a number of neurobiological processes in disorders of the Central nervous system. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostojaniya*. 2011; 2: 28-33. (in Russian)
2. Chistyakova G.N., Remizova I.I., Gazieva I.A., Tarasova M.N. Cytokine profile in newborns with perinatal lesions of CNS. *Vestnik Ural'skoj meditsinskoj akademicheskoy nauki*. 2012; 4 (41): 182-3. (in Russian)
3. Sidel'nikova V.M., Suhikh G.T. Miscarriage: a Guide for practicing physicians. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2010. (in Russian)
4. Kulakov V.I., ed. Clinical guidelines. Obstetrics and gynecology. Moscow: GEOTAR-Media; 2017. (in Russian)
5. Makarov O.V., Gankovskaja L.V., Bahareva I.V., Kuznecov P.A., Kartashov D.D. Modern methods of treatment in preterm labor. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2009; 2: 29-34. (in Russian)
6. Shirshov S.V. Mechanisms of immune-endocrine control of reproduction processes. Ekaterinburg: *Ural'skoe otdelenie Rossiyskoj akademii nauk*; 2002. (in Russian)
7. Sotnikova N.Yu., ed. Immunological mystery of pregnancy. Ivanovo: Izdatel'stvo MIK; 2005. (in Russian)
8. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines [Tsitokiny]. St.Peterburg: «Izdatel'stvo foliant»; 2008. (in Russian)
9. Ivanenkova N.I., Borzova N.Ju., Sotnikova N.Ju. Differentiation of peripheral t-helpers and cytotoxic T-lymphocytes in women with habitual miscarriage depending on the outcome of pregnancy. *Meditsinskaya immunologiya*. 2015; 17: 267. (in Russian)
10. Kolobova A.V., Sotnikova N.YU., Borzova N.YU. The contents of soluble form of receptor for glycation end products and protein S100B in miscarriage in the later stages. *Vestnik ural'skoj meditsinskoj akademicheskoy nauki*. 2012; 4 (41): 122-3. (in Russian)
11. Volodin N.N., Rumyantsev A.G., Vladimirkaya E.B., Degtyareva M.V. Cytokines and preterm birth. *Pediatrics*. 2001; 4: 72-6. (in Russian)
12. Kolobova A.V., Sotnikova N.Yu., Borzova N.Yu. The contents of protein S100B and SRAGE in threatening preterm births 22 to 27 weeks. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2013; 7 (2-3): 313. (in Russian)
13. Smirnova A.V., Borzova N.Yu., Sotnikova N.Yu., Malyschkina A.I. Features of the content of the soluble form of the receptor for glycation end products at very early threatening premature. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2017; 10: 35-9. (in Russian)
14. Malyschkina A., Kolobova A., Sotnicova N., Borzova N. The content of SRAGE and S100B protein in serum of women with uncomplicated and complicated by threatening preterm labor pregnancy. *Journal of Perinatal Medicine*. 2013; 41: 767.
15. Louis J. Sparvero, Denise Asafu-Adjei, Rui Kang, Daolin Tang, Neilay Amin, Jaehyun Im et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), RAGE Ligands, and their role in Cancer and Inflammation. *Journal of Translational Medicine*. 2009; 7-17.
16. Buhimschi C.S., Baumbusch M.A., Dulay A.T., Oliver E.A., Lee S., Zhao G. et al. Characterization of RAGE, HMGB1, and S100 β in Inflammation-Induced Preterm Birth and Fetal Tissue Injury. *Am. J. Pathol.* 2009; 175(3): 958-75.
17. Hajek Z., Germanova A., Koucky M., Zima T., Kopecky P., Vitkova M. et al. Detection of feto-manernal infection/inflammation by the soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE): result of a pilot study. *J. of perinat. Med.* 2008; 36(5): 399-404.
18. Germanova A., Koucky M., Hajek Z., Parizek A., Zima T., Kalasova M. Soluble receptor for advanced glycation end products in physiological and pathological pregnancy. *Clin. Biochim.* 2010; 43(4-5):442-6.
19. Borzova N.Yu., Sotnikova N.Yu., Kolobova A.V. *The method of predicting perinatal hypoxic lesions of the Central nervous system in newborns*. Patent RU № 2542463 MPK G 01N33/53; 2013. (in Russian)
20. Taketoshi Noguchi, Toshiyuki Sado, Katsuhiko Naruse, Hiroshi Shigetomi, Akira Onogi, Shoji Haruta et al. Evidence for activation of Toll-like receptor and receptor for advanced glycation end products in preterm birth. *Mediators of inflammation*. 2010; Article ID 490406: 10.
21. Gaens K.H., Ferreira I., van der Kallen C.J., van Greevenbroek M.M., Blaak E.E., Feskens E.J. et al. Association of polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating RAGE levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; 94(12): 5174-80.
22. Lu H.Y., Ma J.L., Shan J.Y., Zhang J., Wang Q.X., Zhang Q. High-mobility group box-1 and receptor for advanced glycation end products in preterm infants with brain injury. *World J. Pediatr.* 2017 Jun; 13 (3): 228-35.
23. Baumbusch M.A., Buhimschi C.S., Oliver E.A., Zhao G., Thung S., Rood K., Buhimschi I.A. High Mobility Group-Box 1 (HMGB1) levels are increased in amniotic fluid of women with intra-amniotic inflammation-determined preterm birth, and the source may be the damaged fetal membranes. *Cytokine*. 2016 May; 81:82-7.
24. Zolakova B., Zolak V., Hatok J., Matasova K., Nosal S., Zibolen M. Soluble receptor for advanced glycation end products in late-onset neonatal infection. *Bratisl. Lek. Listy*. 2016; 117(1): 15-8.
25. Garcia-Salido A. I., Oñoro G., Melen G.J., Gómez-Piña V., Serrano-González A., Ramírez-Orellana M., Casado-Flores J. Serum sRAGE as a potential biomarker for pediatric bronchiolitis: a pilot study. *Lung*. 2015 Feb; 193(1):19-23.
26. Rogers L.K., Graf A.E., Bhatia A., Leonhart K.L., Oza-Frank R. Associations between maternal and infant morbidities and sRAGE within the first week of life in extremely preterm infants. *PLoS. One*. 2013 Dec 6;8(12):e82537.
27. Thomas W., Seidenspinner S., Kawczyńska-Leda N., Wirbelauer J., Szymankiewicz M., Speer C.P. Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in tracheobronchial aspirate fluid and cord blood of very low birth weight infants with chorioamnionitis and funisitis. *Early. Hum. Dev.* 2010 Sep; 86(9): 593-8.
28. Constantine M.M. et al. Umbilical cord blood biomarkers of neurologic injury and the risk of cerebral palsy or infant death. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2011; 28(9): 917-22.

Поступила 18.01.19
Принята к печати 24.01.19

Новиков Ю.А.¹, Охлопков В.А.¹, Индутный А. В.², Кравченко Е.Н.¹.

ИНТЕРЛЕЙКИНЫ - 23, -12P40 КАК МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ НЕЙРОСИФИЛИСЕ

¹Кафедра дерматовенерологии и косметологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644001, Омск, Россия;

²Кафедра клинической лабораторной диагностики ДПО ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644001, Омск, Россия

Цель работы – изучить особенности цитокинов у больных различными формами нейросифилиса. Проведено комплексное лабораторное обследование больных нейросифилисом и сифилисом без специфического поражения нервной системы, которые наблюдались в венерологическом отделении БУЗ ОО «Клинический кожно-венерологический диспансер» г. Омска, с целью определить концентрацию интерлейкинов – 23, 12p40 в ликворе и оценить их взаимосвязь с течением сифилитической инфекции. Установлено наличие закономерностей и особенностей в отклонении иммунного статуса при нейросифилисе. Анализ иммунологических изменений в ликворе больных показал, что у пациентов с нейросифилисом, вне зависимости от наличия или отсутствия клинических симптомов, уровни IL-23 и IL-12p40 в ликворе значительно превышают аналогичные показатели у пациентов без специфического поражения нервной системы.

Ключевые слова: нейросифилис; сифилис; интерлейкин 12p40; интерлейкин 23; ликвор.

Для цитирования: Новиков Ю.А., Охлопков В.А., Индутный А.В., Кравченко Е.Н. Интерлейкины - 23, -12p40 как маркеры повреждения нервной ткани при нейросифилисе. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64(2): 94-97. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-64-2-94-97>

Novikov Yu.A.¹, Okhlopkov V.A.¹, Indutny A.V.², Kravchenko E.N.¹.

INTERLEUKINS - 23, -12P40 AS MARKERS OF NEURAL TISSUE DAMAGE IN NEUROSYPHILIS

¹Department of Dermato-venereology Omsk state medical university, Omsk, 644099, Russian Federation;

²Department of clinical laboratory diagnostics Omsk state medical university, Omsk, 644099, Russian Federation

To study the features of cytokines in patients with various forms of neurosyphilis. The complex laboratory examination of patients with neurosyphilis and syphilis without specific lesion of the nervous system was observed in the venereological department of the OSH "Clinical Dermatological and Venereological Dispensary" in Omsk in order to determine the concentration of interleukins - 23, 12p40 in CSF and assess their relationship with the course of syphilitic infection. The presence of regularities and features in the deviation of the immune status in the examined disease was established. Analysis of immunological changes in patients' cerebrospinal fluid showed that in patients with neurosyphilis, regardless of the presence or absence of clinical symptoms, the levels of IL-23 and IL-12p40 in CSF significantly exceed those in patients without specific lesion of the nervous system.

Key words: neurosyphilis; syphilis; interleukin - 12p40; interleukin - 23; liquor.

For citation: Novikov Yu.A., Okhlopkov V.A., Indutny A.V., Kravchenko E.N., Interleukins - 23, -12p40 as markers of neural tissue damage in neurosyphilis. Russian clinical laboratory diagnostics. 2018; 64(2): 94-97. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-94-97>

For correspondence: Novikov Yu. A., MD, PhDdocent, doctor of medical Sciences, Professor; e-mail: buzoo.kkvd@mail.ru

Information about authors:

Novikov Yu.A., SPIN-код: 2709-3818;

Ochlopkov V.A., SPIN-код: 1202-6653;

Indutny A.V., SPIN-код: 5458-0238;

Kravchenko E.N., <http://orcid.org/0000-0001-8625-8237>.

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 30.07.2018
Accepted 05.09.2018

Верификация нейросифилиса, несмотря на широкий спектр методов диагностики, продолжает сохранять ряд проблемных моментов [1].

Они обусловлены, прежде всего, некоторыми биологическими особенностями *T.pallidum*, в результате чего высокая вероятность обнаружения собственно

возбудителя возможна лишь на начальных периодах заболевания. В последующем доступной становится только серологическая диагностика. В свою очередь, ее результаты нередко бывают дискордантны, а в ряде случаев даже и противоречивы, что затрудняет их интерпретацию [2,3].

Также следует отметить, что проблема ранней диагностики нейросифилиса всегда стояла остро, поскольку в большинстве случаев сифилитический процесс в центральной нервной системе протекает

Для корреспонденции: Новиков Юрий Александрович, д-р мед. наук, доц., проф.; e-mail: buzoo.kkvd@mail.ru.

бессимптомно и не имеет четких клинических признаков. Однако основные трудности в решении вопроса о наличии специфического поражения нервной системы возникают все же при трактовке результатов специфических сифилитических тестов крови и ликвора, которые, как известно, являются косвенными. Различные данные о чувствительности и специфичности методов лабораторной диагностики нейросифилиса также затрудняют корректную оценку степени повреждения нервной ткани [1,4]. Следует отметить, что не решена и проблема прогнозирования течения нейросифилиса. Недостаточно изучена и систематизирована роль иммунных процессов и их значение в прогрессировании повреждения нервной системы [4].

Таким образом, на сегодняшний день сохраняется необходимость поиска дополнительных лабораторных критериев в диагностике нейросифилиса.

С этой точки зрения определенный интерес могут представлять интерлейкины.

Интерлейкины – это белки, продуцируемые активированными клетками иммунной системы и осуществляющие контроль иммунных реакций [5]. Мы уделили внимание изучению интерлейкина (IL) – 23 и – 12p40 по следующим причинам.

Известно, что ИЛ-23 продуцируется дендридными клетками, и имеет важное значение в патогенезе развития поражения нервной системы. Дендридные клетки пациентов с поражением нервной системы продуцируют большее количество ИЛ-23, чем дендридные клетки здоровых людей [6,7,9]. На данном этапе изменения концентрации ИЛ -23 в ликворе при различных заболеваниях мало изучены.

ИЛ-12 является ключевым цитокином для усиления клеточно - опосредованного иммунного ответа и инициации эффективной противовоспалительной защиты [8,9]. Кроме того, есть сведения о том, что данный цитокин может мобилизовать натуральные киллеры лимфоидных органов при развитии аутоиммунного процесса, что также вызывает большой интерес исследователей [6-9].

В своей работе мы изучали особенности иммунологических изменений в цереброспинальной жидкости (на примере ИЛ-23, ИЛ-12p40) при нейросифилисе и сифилисе без доказанного поражения нервной системы.

Материал и методы. Нами было обследовано 87 пациентов, из них 46 больных нейросифилисом (группа 1) и 41 больной сифилисом без поражения нервной системы (группа 2). В свою очередь, группа 1 была разделена на две подгруппы: 1а - больные асимптомным нейросифилисом ($n=32$) и 1б - больные нейросифилисом с симптомами ($n=14$). Набор клинического материала осуществлялся на базе венерологического отделения БУЗ ОО «Клинического кожно-венерологического диспансера». Средний возраст больных составил $42,8 \pm 11,9$ лет (от 19 до 68 лет).

Критериями включения были следующие:

Возраст 18-68 лет.

Обязательное добровольное письменное согласие пациента или его доверенного лица на участие в исследовании.

Наличие положительных серологических реакций в сыворотке крови, неврологических симптомов или сифилиса в скрытой или поздней форме, или вторичного сифилиса с проявлениями в виде алопеции и лейкодермы.

Заключение невролога о необходимости проведения ликвородиагностики и отсутствии сопутствующих заболеваний, влияющих на исследование.

Критериями исключения являлись:

Наличие у больного документально подтвержденного сопутствующего заболевания, способного повлиять на результат исследования.

Наличие в анамнезе у больного повреждения головного мозга при черепно-мозговых травмах.

Отсутствие готовности к сотрудничеству со стороны пациента, отказ пациента от участия в исследовании.

Помимо стандартной серологической диагностики крови и ликвора, у всех обследуемых в ликворе дополнительно определяли концентрацию цитокинов ИЛ-23 и ИЛ- 12p40 иммуноферментным методом с помощью тест-систем «eBioscience» («Bender Med-Systems», США) на планшетном фотометре «iMark», («BIORAD», США). Взятие крови и ликвора у одного больного проводили в течение первых суток от момента госпитализации и до начала терапии с интервалом не более 30 минут.

Статистическая обработка осуществлялась в программе «Statistica 6.0». Числовые значения изученных параметров представлены в виде $Me (0,25; 0,75)$. При сравнении количественных признаков двух анализируемых совокупностей не связанных выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали t -критерий Стьюдента. Критерий Манна-Уитни применяли в тех случаях, когда сравниваемые совокупности не подчинялись закону нормального распределения. Для категориальных переменных строили таблицы сопряженности и применяли Хи-квадрат (X^2). При частотах меньше 10 использовали X^2 с поправкой Йетса на непрерывность. При ожидаемых частотах меньше 5 дополнительно использовали двусторонний точный критерий Фишера. Корреляционный анализ проводили с помощью коэффициентов Гамма (Gamma, G) и Спирмена (R). Использовалась следующая классификация силы корреляции в зависимости от значения коэффициента корреляции G (R):

$G(R) \leq 0,25$ — слабая корреляция,

$0,25 < G(R) < 0,75$ — умеренная (средняя) корреляция,

$G \geq 0,75 (R)$ — сильная корреляция.

Для сравнения различных методов диагностики использовали расчет чувствительности (Se), который определялся по формуле:

$$Se = A/N \cdot 100\%, \quad (1)$$

где A – количество пациентов с истинно положительным результатом, N- общее количество обследованных пациентов.

Результаты. Из 87 обследованных пациентов 56 (65,1%) составили мужчины. 29 (63%) пациентов 1 группы и 37 (90,2%) пациентов 2 группы не предъявляли каких-либо жалоб. Среди клинических проявлений нейросифилиса у больных наиболее часто встре-

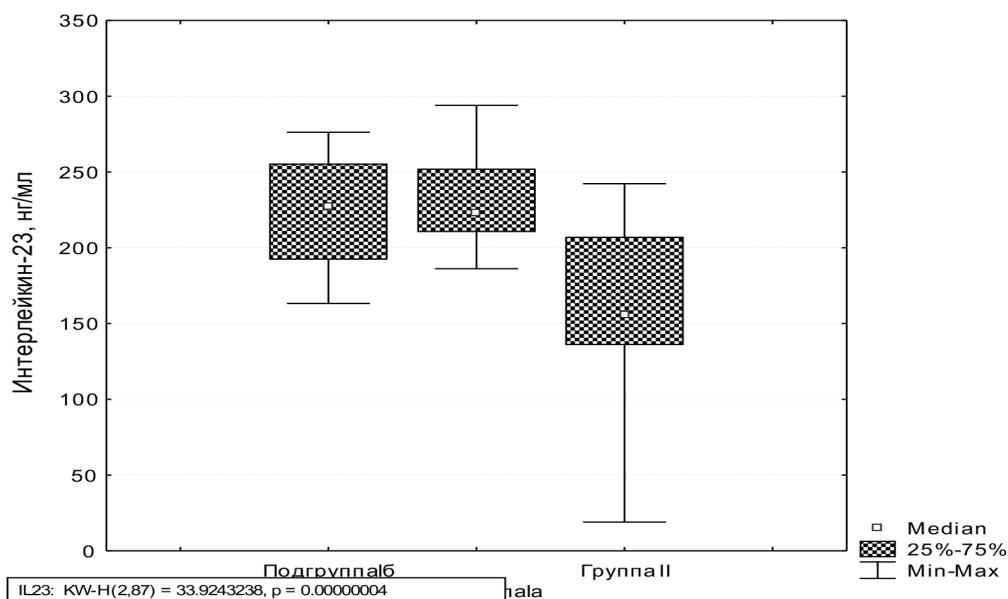


Рис. 1. Уровень IL-23 в ликворе у пациентов.

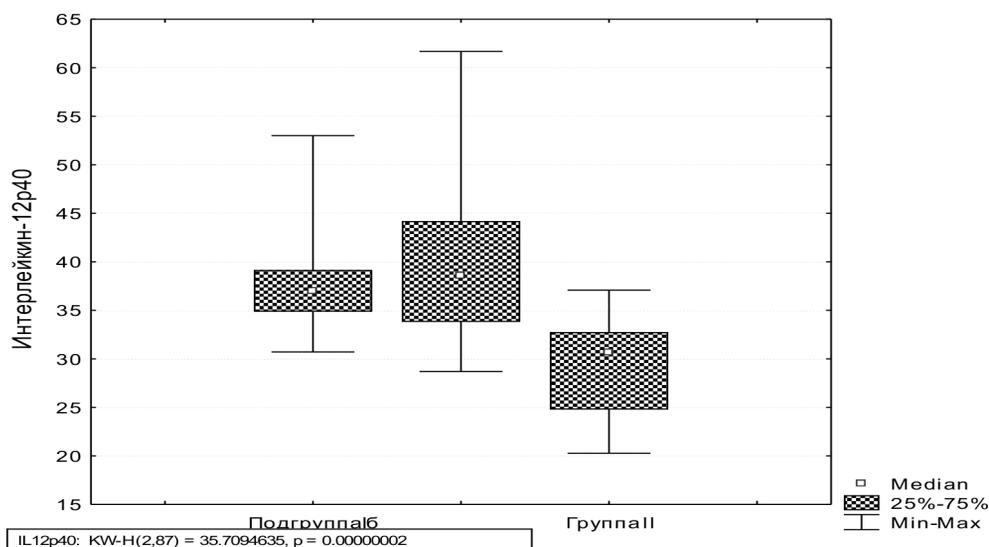


Рис. 2. Уровень IL-12p40 в ликворе у пациентов.

чались снижение зрения (15,6%), снижение памяти (6,25%), головная боль (6,25%).

У пациентов с нейросифилисом уровень IL-23 в среднем составлял 224,49 (208,3; 252,28) пг/мл. Таким образом, в группе 1 уровень IL-23 был на 44,2% выше по сравнению с группой 2 ($p=0,000001$).

У пациентов с асимптомным течением нейросифилиса уровень IL-23 в среднем составлял 222,9 (210,4; 252,3) пг/мл. У пациентов с клиническими проявлениями нейросифилиса уровень IL-23 в среднем составлял 227,1 (192,1; 255,6) пг/мл (рис. 1). Статистически значимой разницы между этими показателями не было. Корреляционной связи между наличием клинических проявлений болезни и уровнем IL-23 также не выявлено ($G=0,068$, $p=0,66$).

У пациентов с нейросифилисом уровень IL-12p40 в среднем составлял 37,5 (33,8; 43,6) пг/мл, что было на 22,1% выше в сравнении с группой больных сифилисом без доказанного поражения нервной системы ($p=0,000001$).

У пациентов с асимптомным течением нейросифилиса уровень IL-12p40 в среднем составлял 38,6 (33,8; 44,2) пг/мл. У пациентов с клиническими проявлениями нейросифилиса уровень IL-12p40 в среднем составлял 37,0 (34,9; 39,2) пг/мл (рис. 2). Статистически значимой разницы между этими показателями не было. В настоящем исследовании корреляционной связи между наличием клинических проявлений болезни и уровнем IL-12p40 не выявлено ($G=0,10$, $p=0,52$).

Отмечено, что у пациентов с нейросифилисом, вне

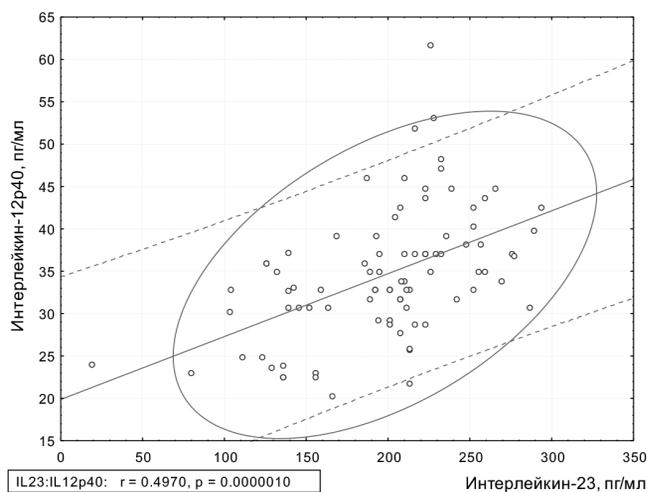


Рис. 3. Корреляционная связь между уровнями ИЛ-23 и ИЛ-12p40 в ликворе пациентов с сифилисом.

зависимости от наличия или отсутствия клинических симптомов, уровни ИЛ-23 и ИЛ-12p40 в ликворе значительно превышали аналогичные показатели у пациентов без специфического поражения нервной системы. Это подтверждается и данными корреляционного анализа о наличии связи высокой степени между уровнями данных показателей и поражением нервной системы ($G=-0,73$, $p=0,000001$, $G=-0,77$, $p=0,000001$ соответственно), а также между собой (рис. 3).

Заключение. Следует отметить, что диагностическое и прогностическое значение цитокинов в различных клинических ситуациях является предметом многочисленных научных исследований. Современные технологии предлагают достаточно широкий выбор препаратов для диагностики нейросифилиса [8]. В то же время, потребности практической медицины в отношении методов лабораторной диагностики нейросифилиса обуславливают необходимость разработки не только скрининговых вариантов диагностических методов, но и других высокоинформативных тестов, позволяющих решать сложные диагностические задачи [9]. Анализ полученных результатов позволяет констатировать высокую диагностическую и прогностическую значимость определения концентрации ИЛ-23, ИЛ-12p40 в ликворе больных с целью ранней диагностики нейросифилиса.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новиков А.И., Новиков Ю.А., Кидалов М.Б., Романов А.А., Радул Е.В., Чермошентцев А.А. и др. Особенности течения нейросифилиса на современном этапе. *Омский научный вестник*. 2010; 94 (1): 103—6.

2. Бурдак В.Н., Федотов В.П., Мануйлова Л.А., Погорелов В.В. Клинико-лабораторные параллели изменений спинномозговой жидкости и состояния иммунного статуса у больных ранними стадиями сифилиса. *Вестник дерматологии и венерологии*. 1989; 10: 10—13.

3. Борисенко К.К., Басинская Н.М., Михеев Н.А. Клинико-иммунологическая характеристика больных сифилисом. *Вестник дерматологии и венерологии*. 1985; 7: 24-8.

4. Дюйзен И.В., Иванис В.А., Михайлов А.С., Менчинская Е.С., Манжуло Н.В., Огурцова О.С. Исследование содержания нейрональных маркеров при некоторых инфекционных заболеваниях. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015; 2: 27—30.

5. Есимова И.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В., Хасанова Р.Р., Филинук О.В. Секретция интерлейкинов ИЛ-12, ИЛ-27 мононуклеарными лейкоцитами и экспрессия их рецепторов на Т-лимфоцитах в условиях направленной индукции клеток *in vitro* при туберкулезе легких. *Медицинская иммунология*. 2014; 3: 60—2.

6. Маркелова Е.В., Турмова Е.П., Силаев А.А., Андреев Д.Б., Волков В.В. Роль цитокинов в развитии пневмонии после аортокоронарного шунтирования у больных с ишемической болезнью сердца. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2006; 2: 12—5.

7. Kawanokuchi J. Production and function of IL-17 in microglia. *J. Neuroimmunol.* 2008; 194: 54-61.

8. Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис. Методические указания. Приказ № 87 Минздравсоцразвития РФ от 26.03.2001. КонсультантПлюс: справочно-правовая система. — <http://www.consultant.ru>

9. Young H. Syphilis serology. *Dermatol. Clin.* 1998; 16 (4): 691-8.

REFERENCES

1. Novikov A.I., Novikov Yu.A., Kidalov M.B., Romanov A.A., Radul E.V., Chermoshentsev A.A., etc. Features of a course of neurosyphilis at the present stage. *Omskiy nauchnyy vestnik*. 2010; 1(94): 103 -- 6. (in Russian)

2. Burdak V.N., Fedotov V.P., Manylova L.A., Pogorelov V.V. Clinical and laboratory parallels of changes in cerebrospinal fluid and the state of immune status in patients with early stages of syphilis. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 1989; 10: 10--3. (in Russian)

3. Borisenko K.K., Basinskaya N.M., Mikheev N.A. Clinical and immunological characteristics of patients with syphilis. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 1985; 7: 24--8. (in Russian)

4. Dyuzen I.V., Ivanis V.A., Mikhailov A.S., Menchinskaya E.S., Manzhulo N.V., Ogurtsova O.S. Investigation of the content of neuronal markers in certain infectious diseases. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 2: 27--30. (in Russian)

5. Esimova I.E., Urazova O.I., Novitsky V.V., Khasanova R.R., Filinyuk O.V. Secretion of interleukins IL-12, IL-27 by mononuclear leukocytes and expression of their receptors on T-lymphocytes under direct induction of cells *in vitro* in pulmonary tuberculosis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2014; 3: 60--2. (in Russian)

6. Markelova E.V., Turmova E.P., Silaev A.A., Andreev D.B., Volkov V.V. The role of cytokines in the development of pneumonia after coronary artery bypass grafting in patients with coronary heart disease. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2006; 2: 12--5. (in Russian)

7. Kawanokuchi J. Production and function of IL-17 in microglia. *J. Neuroimmunol.* 2008; 194: 54-61.

8. Statement of selection and diagnostic tests on syphilis: method. instructions: the order from 3/26/2001 No. 87. Medicin health care and social development of the Russian Federation. ConsultantPlus: — <http://www.consultant.ru> (in Russian)

9. Young H. Syphilis serology. *Dermatol. Clin.* 1998; 16 (4): 691-8.

Поступила 30.07.18

Принята к печати 05.09.18

Чуров А.В., Новицкая А.В., Коломейчук С.Н., Олейник Е.К.

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ: РОЛЬ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Институт биологии - обособленное подразделение ФГБУН Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», 185910, Петрозаводск, Россия

Патогенез ревматоидного артрита (РА) определяется комплексным действием генетических факторов и факторов среды, которые могут приводить нарушению баланса между эффекторными и регуляторными компонентами иммунной системы. Значительную роль в поддержании такого баланса играют Т-клетки и, в особенности, регуляторные Т-лимфоциты (Treg), однако механизмы функционирования субпопуляций Т-клеток, а также роль отдельных этиологических факторов при РА до конца не изучены. Целью работы было изучение показателей клеточного иммунитета при РА, в особенности Т- и Treg-клеток при РА в зависимости от степени активности заболевания и наличия цитомегаловирусной (ЦМВ) инфекции. Экспрессию мембранных и внутриклеточных молекулярных маркеров лимфоцитов оценивали с помощью метода многоцветной проточной цитометрии. Содержание антител ЦМВ в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа. У пациентов с РА наблюдалось достоверное снижение количества клеток с фенотипами CD4⁺FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ в зависимости от стадии активности РА. Наличие ЦМВ-инфекции у больных РА сопровождалось снижением числа регуляторных Т-клеток (Treg), CD3⁺ Т-лимфоцитов, CD3⁺CD8⁺ клеток периферической крови. Наряду с этим при РА отмечался рост уровня В-лимфоцитов и CD4⁺CD25⁺ Т-клеток. Отмечено увеличение уровня антител к ЦМВ в зависимости от степени активности РА.

Таким образом, полученные данные предполагают, что наличие ЦМВ-инфекции может оказывать существенное воздействие на состояние отдельных субпопуляций лимфоцитов при развитии РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; аутоиммунные заболевания; цитомегаловирус; Treg-клетки; FOXP3; лимфоциты.

Для цитирования: Чуров А.В., Новицкая А.В., Коломейчук С.Н., Олейник Е.К. Показатели клеточного иммунитета при ревматоидном артрите: роль цитомегаловирусной инфекции. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (2): 98-103. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2019-64-2-98-103>

Churov A.V., Novitskaya A.V., Kolomeichuk S.N., Oleinik E.K.

INDICES OF CELL-MEDIATED IMMUNITY IN RHEUMATOID ARTHRITIS: THE ROLE OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION

Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910, Russian Federation

The pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) is driven by a combined action of genetic and environmental factors, which can upset the balance between the effector and regulatory components of the immune system. An important actor in maintaining such balance is T cells, especially regulatory T lymphocytes (Treg), but the mechanisms behind the functioning of T cell subpopulations and the roles of individual etiological factors in RA have not been fully elucidated. This study aimed to investigate the indices of cell-mediated immunity, especially T- and Treg cells, in RA patients depending on the disease activity and presence of cytomegalovirus (CMV) infection. The expression of membrane and intracellular molecular markers of lymphocytes was estimated by multicolor flow cytometry. The content of antibodies to CMV in blood plasma was measured by enzyme immunoassays. Patients with RA had reliably reduced numbers of cells with the phenotypes CD4⁺FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ correlating with the stage of RA activity. RA patients with CMV infection showed a reduction in the number of regulatory T cells (Treg), CD3⁺ T lymphocytes, CD3⁺CD8⁺ cells in peripheral blood. At the same time, RA involved a rise in the level of B cells and CD4⁺CD25⁺ T cells. The level of antibodies to CMV was observed to grow in line with RA activity. Thus, the data obtained suggest that the presence of CMV infection can significantly influence the state of individual lymphocyte subpopulations during RA development.

Key words: rheumatoid arthritis; autoimmune diseases; cytomegalovirus; Treg cells; FOXP3; lymphocytes.

For citation: Churov A.V., Novitskaya A.V., Kolomeichuk S.N., Oleinik E.K. Indices of cell-mediated immunity in rheumatoid arthritis: the role of cytomegalovirus infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic)*. 2019; 64 (2): 98-103 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-98-103>

For correspondence. Churov A.V., PhD, Senior researcher, Immunology group; e-mail: achourov@yandex.ru

Information about authors:

Churov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-3920-7581>
Novitskaya A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4585-729>
Kolomeichuk S.N., <http://orcid.org/0000-0003-3104-3639>
Oleinik E.K., <https://orcid.org/0000-0001-9266-1129>

Acknowledgment. The studies were funded from the federal budget under state order to KarRC RAS project № 0221-2017-0043, and within RFBR project № 16-04-00567.

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

Received 30.01.2019
Accepted 01.02.2019

Введение. Ревматоидный артрит (РА) – аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, сопровождаемое воспалительными процессами в соединительной ткани суставов. Клиническая картина РА чрезвычайно вариабельна и представлена широким спектром патологических процессов, которые приводят к значительному снижению качества жизни пациентов и сокращению их продолжительности жизни. Пик заболеваемости РА приходится на возрастной период 40-60 лет. Хроническое прогрессирующее течение РА приводит к деструкции суставов, в результате чего возникает высокий риск инвалидизации пациентов. Показатели распространенности РА в мире варьируют в пределах 0,5-2% в различных популяциях [1]. В России распространенность данного заболевания составляет 2-5 % среди взрослого населения трудоспособного возраста. По данным Министерства здравоохранения РФ ежегодно возрастает количество вновь зарегистрированных пациентов с диагнозом РА [2].

Развитие РА сопровождается дисбалансом иммунорегуляторных механизмов обуславливающих функции эффекторных и супрессорных субпопуляций клеток. Эти механизмы в норме ограничивают патологическую активацию Т- и В-лимфоцитов, участвующих в иммуновоспалительных процессах, предупреждают развитие аутореактивности. Аутоиммунные реакции при РА опосредованы преимущественно активностью Т-клеток. Особую роль играют регуляторные Т-клетки (Treg), контролирующие развитие иммунного ответа и супрессию функциональной активности различных субпопуляций иммуноцитов в норме и при патологиях [3-6].

Для характеристики фенотипа Treg-клеток применяют различные мембранные и внутриклеточные молекулярные маркеры, которые, однако, экспрессируются и на других лимфоцитах, что затрудняет изучение функций этих клеток [7,8]. Надежным маркером Treg-лимфоцитов считается транскрипционный фактор forkhead box P3 (FOXP3), участвующий в процессах дифференцировки Treg-лимфоцитов, и играющий ключевую роль в реализации их функций. Фенотип Treg-клеток отличается также высокой конститутивной экспрессией α -цепи рецептора интерлейкина (IL)-2 (CD25) [7]. Литературные данные о количественном содержании в периферической крови различных субпопуляций Т-клеток при РА зачастую неоднозначны. Было показано, что экспериментальная элиминация Treg-лимфоцитов приводит к экспансии Т-клеток эффекторов и к развитию аутоиммунных реакций [9].

Следует отметить, что механизмы, обеспечивающие супрессию аутоиммунного ответа на клеточном уровне, изучены недостаточно. Предполагается, что нарушение иммунной регуляции с участием Treg-клеток при РА может быть вызвано снижением количества этих клеток и/или ослаблением их функциональной активности. Однако результаты работ разных авторов по данной проблеме не всегда согласуются между собой [10-12]. В связи с этим изучение состояния пула Treg-клеток при РА представляется очень важным для понимания патогенеза заболевания и разработки эффективных иммуноотерапевтических подходов.

Несмотря на колоссальный прогресс в развитии современных подходов лечения РА, этиология и патогенез данного заболевания по-прежнему остаются мало изученными. Этиологические факторы РА в настоящее время не установлены. Однако все большее внимание исследователей отводится роли вирусных инфекций в развитии РА.

Значительный интерес представляет изучение роли цитомегаловируса человека (ЦМВ), оказывающего существенное влияние на модуляцию функций отдельных иммуноцитов и развитие воспалительных процессов у пациентов с РА. ЦМВ широко распространен в популяции и обладает высокой тропностью к некоторым популяциям лимфоидных клеток, которые в свою очередь играют важную роль в патогенезе основного заболевания - РА. Несмотря на то что, роль ЦМВ в развитии аутоиммунных заболеваний не доказана, ряд работ продемонстрировали роль ЦМВ, как возможного этиологического фактора при таких заболеваниях, как Синдром Сьоргена и системная красная волчанка.

Данные литературы о роли ЦМВ-инфекции при развитии РА неоднозначны. Было показано, что при РА ЦМВ-инфекция может приводить к экспансии клонов антиген-специфичных Т-клеток, а также к повышению экспрессии лейкоцитарного Ig-подобного рецептора NK-клеток LIR-1 на мембране Т-клеток пациентов с РА [13].

ДНК ЦМВ обнаружена в периферической крови [14], синовиальной жидкости сустава [14,15], синовиальной оболочке пациентов с РА [15]. Изучение серологических показателей по уровню специфических антител также указывает на потенциальную роль ЦМВ-инфекции в развитии РА [16].

Учитывая текущее состояние проблемы целью работы было изучение изменений субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток и, прежде всего, Treg-лимфоцитов у больных РА на фоне ЦМВ-инфекции.

Материал и методы. Исследовательский материал получен при содействии кафедры госпитальной терапии медицинского института ПетрГУ на базе ГБУЗ РК «Республиканская больница им. В. А. Баранова». Проведение научно-исследовательской работы одобрено в Комитете по медицинской этике при ПетрГУ и Министерстве здравоохранения и социального развития Республики Карелия (протокол от 12.02.2013 г. № 25).

В ходе исследования был проведен анализ 24 образцов периферической крови пациентов с диагнозом «ревматоидный артрит» в возрасте 60,59±10,86 лет. Критерии включения пациентов в исследование: мужчины и женщины 18-85 лет с подтвержденным диагнозом «ревматоидный артрит», проинформированные и подписавшие согласие об участии в эксперименте. Критерии исключения из работы: инфекционно-воспалительные заболевания за последний месяц, беременность и лактация, курение, сахарный диабет, наличие иных заболеваний, влияющих на функциональность Treg-клеток (аллергии, наличие опухолей и аутоиммунных заболеваний, за исключением РА). Постановка диагноза «ревматоидный артрит» прово-

Содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови здоровых лиц и больных РА в зависимости от степени активности РА

Фенотипы	Контроль (n= 18)	Больные РА (n= 24)		
		Все больные (n= 24)	I степень активности (n= 9)	II-III степень активности (n= 15)
CD3 ⁺	60,4±7,2	62,4±11,8	61,7±9,5	64,4±10,8
CD3 ⁺ CD4 ⁺	39,1±5,6	43,0±10,1*	42,06±12,4	46,42±9,13*
CD4 ⁺ CD25 ⁺	9,0±1,7	18,4±4,8 *	16,8±3,2*	20,3±4,6*
CD3 ⁺ CD8 ⁺	22,3±5,5	19,2±6,9	20,7±4,8	17,8±3,5
CD3 ⁺ CD19 ⁺	9,1±1,6	10,3±4,6	8,6±1,5	11,8±4,8
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	15,1±5,4	11,1±5,4 *	6,83±2,1*	13,4±5,7
CD4 ⁺ FOXP3 ⁺	6,97±3,2	7,03±3,2	8,64±3,4*	4,35±0,7*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	4,39±0,8	4,35±1,5	5,37±1,5*	3,57±0,9*

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$. Содержание клеточных популяций представлено как % от гейта лимфоцитов, определенного по параметрам прямого и бокового светорассеивания, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ - от гейта CD4⁺ лимфоцитов.

дидась с использованием критериев Американской коллегии ревматологов (ACR) (1987 г.) [5]. Пациенты проходили терапию на основе базисных противовоспалительных препаратов.

В качестве контроля анализировали лимфоцитарную фракцию 18 здоровых доноров (53,78±12,3 лет). Забор материала в стандартные вакуумные пробирки, содержащие антикоагулянт ЭДТА К₃ объемом 4 мл проводили из локтевой вены. С целью исследования лимфоцитов цельной крови применяли метод многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 («Beckman Coulter», США). Окрашивание клеток осуществлялось моноклональными антителами: CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PC5, CD19-PC7, CD16/56-PE, CD4-PC7, CD25-PC5 («Beckman Coulter», США), FOXP3-FITC (eBioscience, США) и соответствующими изотипическими контролями. Для внутриклеточного окрашивания антителами к FOXP3 применяли набор реагентов с возможностью пермеабилзации и фиксации клеток (eBioscience, США). Определение антител к ЦМВ в плазме проводили с использованием метода иммуноферментного анализа и коммерческого набора ВектоЦМВ («Вектор-Бест», Россия).

Статистическая обработка данных проводилась в пакете программ «Statistica 6.0». С целью статистического изучения и оценки характера связи между признаками использовался непараметрический коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для установления достоверности различий (при уровне значимости $p < 0,05$) между группами применялся критерий Уилкоксона-Манна-Уитни. Представленные данные имеют вид - $M \pm SD$. Исследование проводилось на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр РАН».

Результаты. В данной работе была проведена оценка относительного содержания основных субпопуляций лимфоцитов (цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов, В-клеток, натуральных киллеров), а также Трег-клеток. В общей группе пациентов с поставленным диагнозом «ревматоидный артрит», по сравнению с контрольной группой, наблюдалось достоверное увеличение численности Т-хелперов

(CD3⁺CD4⁺) и активированных CD4⁺CD25⁺Т-клеток, а также снижение НК с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (табл. 1). Достоверные различия в других субпопуляциях лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺ и CD3⁺CD8⁺) и клеток экспрессирующих FOXP3 (CD4⁺FOXP3⁺ и CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) отсутствовали.

При прогрессировании РА были установлены значительные изменения в популяционном составе лимфоцитов, в т.ч. Трег-клеток. Разделение пациентов на две группы осуществлялось в зависимости от стадии активности заболевания: первая группа - I степень активности (минимальная), вторая группа - II (средняя) и III (высокая) степенями активности (см. табл. 1). Наивысший уровень Т-хелперов отмечался в случае пациентов с II-III степенью РА (46,42±9,13 против 39,1±5,6 в контроле, $p < 0,05$). Также было отмечено достоверное увеличение активированных клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺ как в первой, так и во второй группах, при этом сравнительная характеристика с контрольной группой показала, что содержание данной субпопуляции клеток вдвое превышает норму в группе со II и III степенями активности. Вместе с тем, с ростом степени активности заболевания наблюдаются значительные изменения в содержании Трег-клеток, экспрессирующих маркер FOXP3. У пациентов с I степенью активности ревматоидного артрита число CD4⁺FOXP3⁺ и CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ клеток было выше по сравнению с контролем, тогда как в группе пациентов с II и III степенью РА число FOXP3⁺ было достоверно ниже ($p < 0,05$). Так, содержание Трег-клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ на ранней стадии заболевания составило 5,37±1,5%, а по мере прогрессирования (у пациентов с II и III степенью активности) - 3,57±0,9, против 4,39±0,8% в контроле ($p < 0,05$). Была выявлена обратная корреляция между степенью активности РА, количеством CD4⁺FOXP3⁺ клеток (-0,49, $p = 0,03$) и CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Трег-клеток (-0,54, $p = 0,02$).

В данном исследовании проводили оценку влияния цитомегаловирусной инфекции на патогенез РА и состояние различных субпопуляций лимфоцитов. Для этого проводили анализ наличия специфических антител к ЦМВ. Среди пациентов было установлено

Таблица 2

Содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови больных РА в зависимости от присутствия антител к ЦМВ.

Фенотипы	Контроль (n=18)	Больные РА	
		Серонегативные к ЦМВ (n=16)	Серопозитивные к ЦМВ (n=8)
CD3+	60,4±7,2	66,7±8,3*	51,7±9,5*#
CD3+CD4+	39,1±5,6	50,9±10,1*	41,2±5,6#
CD4+CD25+	9±1,7	17,7±5,6*	18,6±4,6*
CD3+CD8+	22,3±5,5	20,3±6,3	14,8±5,3*#
CD3-CD19+	9,1±1,6	8,7±3,8	13,5±4,6*#
CD3-CD16+CD56+	15,1±5,4	11,3±4,6*	13,3±5,9

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$). # - различия достоверны по сравнению с серонегативными к ЦМВ больными РА при $p < 0,05$. Содержание клеточных популяций представлено как % от гейта лимфоцитов, определенного по параметрам прямого и бокового светорассеивания, CD4+CD25+ - от гейта CD4+ лимфоцитов.

33% серопозитивных лиц по титру антител к ЦМВ. В контрольной группе число ЦМВ-серопозитивных лиц составило 5,3%. Вместе с тем была отмечена положительная корреляция между уровнем антител класса IgM к ЦМВ и стадией активности ревматоидного артрита ($r=0,59$, $p < 0,05$). В группе ЦМВ-серопозитивных пациентов с ЦМВ-инфекцией нами выявлено достоверное понижение уровня Т-лимфоцитов, ЦТЛ, Т-хелперов, а также повышение численности В-лимфоцитов, по сравнению с группой состоящей из ЦМВ-серонегативных пациентов ($p < 0,05$). Было отмечено, что количество активированных Т-хелперов не менялось в зависимости от на-

личия антител к ЦМВ (табл. 2).

Изучение группы ЦМВ-серопозитивных пациентов показало значительное снижение уровня Treg-клеток (в сравнении с ЦМВ-серонегативными больными РА и контролем) (рис.1). При ревматоидном артрите наблюдается обратная корреляция между уровнем IgM антител к ЦМВ и Treg-клеток с фенотипами CD4+FOXP3+ ($-0,43$, $p=0,04$), а также CD4+CD25+FOXP3+ ($-0,46$, $p=0,03$).

Обсуждение. Аутоиммунные заболевания, включая РА, определяются как клинические состояния, сопровождаемые активацией иммуноцитов, в особенности Т- и В-клеток, и вызывающие развитие воспалений и деструкцию тканей. Другим важным звеном в процессе аутоиммунизации являются Treg-клетки, снижение количества или нарушение функциональной активности которых приводит к несостоятельности механизмов иммунной супрессии. Имеющиеся данные о качественном и количественном содержании Treg-клеток при РА достаточно противоречивы, поскольку ранее отмечалось как снижение, так и увеличение их уровня. Также, многие исследования не подтвердили отличие от нормы по содержанию Treg-клеток у пациентов с РА [1].

В данной работе мы провели анализ показателей клеточного иммунитета у пациентов с РА в зависимости от степени активности заболевания и наличия ЦМВ-инфекции.

По полученным данным, при ревматоидном артрите происходит значительное увеличение доли субпопуляций CD4+ Т-хелперов - основных эффекторов патологического процесса воспаления при РА. С ростом активности РА эти показатели имеют тенденцию к ро-

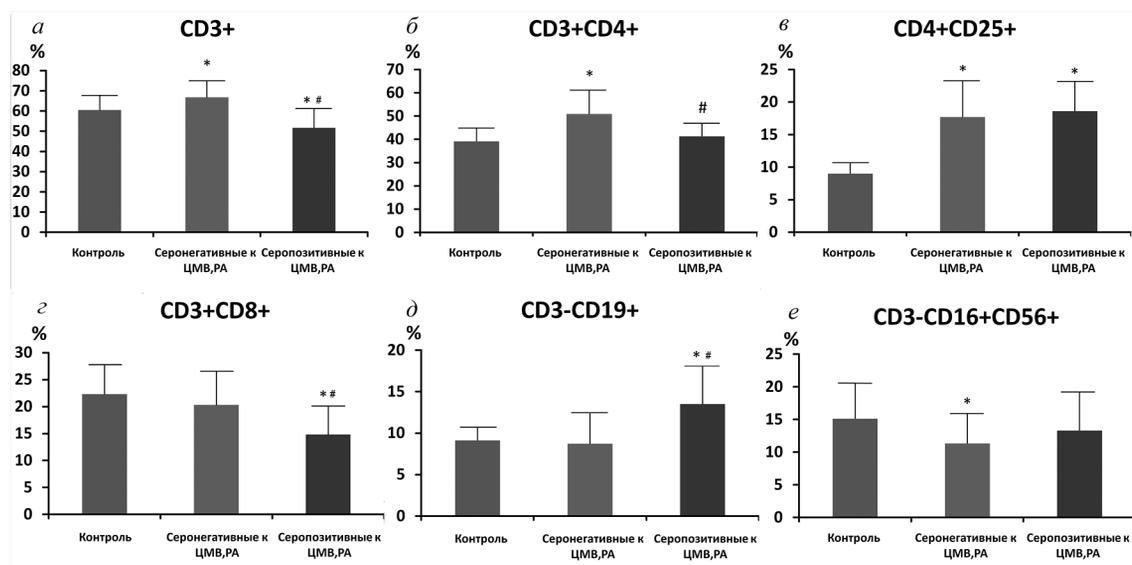


Рис. 1. Содержание периферических лимфоцитов у здоровых доноров и больных РА в зависимости от присутствия в их крови титра антител IgM к ЦМВ.

а – Т-лимфоциты; б – Т-хелперы; в – Активированные Т-лимфоциты; г – Т-супрессоры/цитотоксические; д – В-лимфоциты; е – NK – клетки.

Примечание. Здесь и на рис. 2 – * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$); # – различия достоверны по сравнению с серонегативными к ЦМВ больными РА при $p < 0,05$.

Содержание клеточных популяций представлено как % от гейта лимфоцитов, определенного по параметрам прямого и бокового светорассеивания, CD4+CD25+ – от гейта CD4+ лимфоцитов.

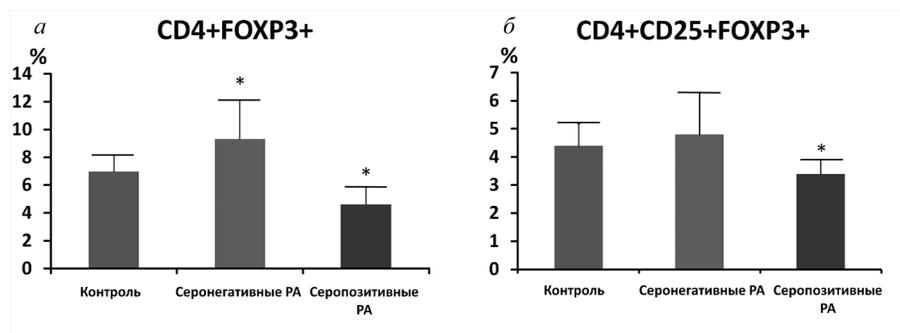


Рис. 2. Содержание Трег-клеток у здоровых доноров и больных РА в зависимости от присутствия в их крови титра антител IgM к ЦМВ.

a – CD4+FOXP3+ Т-клетки; *б* – Трег-клетки. Содержание CD4+FOXP3+, CD4+CD25+FOXP3+ клеточных популяций представлено как % от гейта CD4+ лимфоцитов.

сту, что соответствует классической картине развития этого заболевания.

Результаты оценки состояния пула Трег-клеток оказались не столь однозначны. На ранних этапах развития ревматоидного артрита было зафиксировано увеличение доли Трег-клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор FOXP3. Затем, с ростом степени активности заболевания (I - средняя и II - высокая), обнаруживалось достоверное снижение численности Трег-клеток как в сравнении с группой пациентов с I степенью активности, так и контролем.

По всей вероятности, у пациентов с I степенью активности, Трег-клетки эффективнее сдерживают процесс воспаления, что соответствует пониженным показателям Т-хелперов. По мере прогрессирования РА, у пациентов с II и III степенью активности заболевания, наблюдалось уменьшение количества Трег-клеток периферической крови наряду с ростом показателей Т-хелперов, равно, как и CD4⁺CD25⁺ активированных клеток. Изучение литературных данных, содержащих результаты исследований, показало негативную корреляцию между уровнем Трег-клеток и степенью активности РА по критерию DAS28 (Disease Activity Score for 28 joints) [17,18]. По мнению других авторов такой связь отсутствует [19].

В связи с этим, представляет значительный интерес понимание механизмов, приводящих к нарушению функционального состояния и содержания Трег-клеток при РА. В последние годы активно обсуждается гипотеза, рассматривающая герпесвирусную инфекцию как возможный этиологический фактор, инициирующий аутоиммунизацию. Исследуется роль ЦМВ-инфекции при различных аутоиммунных заболеваниях. Однако степень вовлеченности ЦМВ-инфекции в процессы возникновения и развития РА, а также ее влияние на состояние субпопуляций лимфоцитов, не установлены.

Одним из центральных механизмов влияния ЦМВ-инфекции на патогенез РА можно считать индукцию ЦМВ-специфичных регуляторных Т-клеток, при этом источником дифференцировки Трег являются зрелые CD4⁺Т-хелперы [7,20].

ЦМВ-инфекция человека вызывает стойкие из-

менения в иммунной системе, которые приводят к способности FOXP3⁺ Трег-клеток супрессировать эффекторные Т-лимфоциты и стимулировать репликацию ЦМВ в слюнных железах и в селезенке в острую инфекционную фазу. При этом сокращение уровня Трег-клеток приводит к значительному увеличению ЦМВ-специфических CD4⁺ Т и CD8⁺ Т-клеток. Значительный вклад в данных реакциях играют молекулярные механизмы, связанные с экспрессией CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4) и трансформирующего фактора роста-β (TGF-β) [21,22].

По нашим данным, у ЦМВ-серопозитивных пациентов с диагнозом «ревматоидный артрит» наблюдается достоверное снижение доли Т-хелперов, экспрессирующих маркер FOXP3, а также Трег-лимфоцитов (рис.2). В тоже время общее содержание CD4 Т-хелперов было значительно выше в группе ЦМВ-серопозитивных пациентов с РА.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у больных с РА происходит смещение баланса между аутореактивными CD4⁺ Т-хелперами и Трег-клетками, что отражает нарушение механизмов супрессии патологических аутореактивных реакций.

Значительное снижение количества Трег-клеток, экспрессирующих маркеры CD25 и FOXP3, наблюдается с ростом активности РА, а также на фоне ЦМВ-инфекции. Кроме того, наблюдается увеличение содержания CD3⁺ Т-лимфоцитов, CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов и CD3⁺CD8⁺ ЦТЛ.

Вероятно, наличие ЦМВ-инфекции способно осложнять течение основного заболевания – РА, поскольку происходит угнетение функций Трег-клеток, которые в норме обеспечивают контроль над развитием иммунновоспалительных реакций.

Понимание роли ЦМВ-инфекции при РА может иметь существенное клиническое значение, в том числе при разработке биомаркеров для персонализированной терапии РА.

Однако в настоящее время недостаточно данных о влиянии ЦМВ-инфекции на конкретные звенья патогенетического каскада РА. Для более детального понимания механизмов действия ЦМВ на клеточное звено иммунной системы при возникновении и раз-

витии РА требуется проведение дальнейших исследований, направленных на изучение функциональных особенностей иммуноцитов.

Финансирование. Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН, тема № 0221-2017-0043, а также при поддержке РФФИ проект № 16-04-00567.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7 – 22 см. REFERENCES)

1. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н., Авдеева А.С. и др. Т-регуляторные клетки при ревматоидном артрите. *Научно-практическая ревматология*. 2014; 52: 430–7.
2. Балабанова Р.М., Эрдес Ш.Ф. Динамика распространенности ревматических заболеваний, входящих в XIII класс МКБ-10, в популяции взрослого населения Российской Федерации за 2000–2010 гг. *Научно-практическая ревматология*. 2012; 52: 10–2.
3. Жулай Г.А., Чуров А.В., Олейник Е.К., Романов А.А., Семакова П.Н., Олейник В.М. Активация CD4⁺CD39⁺ Т-клеток при колоректальном раке. *Вестник РГМУ*. 2018; 3: 49–55.
4. Чуров А.В. Регуляторные Т-клетки и старение организма. *Успехи геронтологии*. 2013; 26: 603–9.
5. Кравченко П.Н., Жулай Г.А., Чуров А.В., Олейник Е.К., Олейник В.М., Барышева О.Ю., Везикова Н.Н., Марусенко И.М. Субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови больных ревматоидным артритом. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2016; 71: 148–53.
6. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Островский К.А., Олейник В.М., Кравченко П.Н., Чуров А.В. Субпопуляционный состав лимфоцитов как показатель иммунной супрессии при остром панкреатите. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2014; 9: 21–5.

REFERENCES

1. Nasonov E.L., Aleksandrova E.N., Avdeeva A.S. et al. T-regulatory cells in rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2014; 52: 430–7. (in Russian)
2. Balabanova R.M., Erdes Sh.F. Trends in the prevalence of rheumatic diseases in ICD-10 in the adult population of the Russian Federation over 2000-2010. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2012; 52: 10–2. (in Russian)
3. Zhulai G.A., Churov A.V., Oleinik E.K., Romanov A.A., Semakova P.N., Oleinik V.M. Activation of CD4⁺CD39⁺ T cells in colorectal cancer. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2018; 3: 49–55. (in Russian)
4. Churov A.V. Regulatory T-cells and aging. *Uspekhi gerontologii*. 2013; 26: 603–9. (in Russian)
5. Kravchenko P.N., Zhulai G.A., Churov A.V., Oleinik E.K., Oleinik V.M., Barysheva O.Yu., Vezikova N.N., Marusenko I.M. Subpopulations of Regulatory T-lymphocytes in the Peripheral Blood of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Vestnik Rossiiskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2015; 71: 148–53. (in Russian)
6. Zhulai G.A., Oleinik E.K., Ostrovskii K.A., Oleinik V.M., Kravchenko P.N., Churov A.V. Alterations of lymphocyte subsets and indicators of immune suppression in patients with acute pancreatitis. *Vestnik Rossiiskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2014; 9: 21–5. (in Russian)

7. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C.M., Hafler D.A. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10: 490–500.
8. Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J., Zaunders J., Sasson S., Landay A., et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 2006; 203: 1693–700.
9. Wang W., Shao S., Jiao Z., Guo M., Xu H., Wang S. The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2012; 32: 887–93.
10. Niu Q., Cai B., Huang Z.C., Shi Y.Y., Wang L.L. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2012; 32: 2731–6.
11. Kim J.R., Chae J.N., Kim S.H., Ha J.S. Subpopulations of regulatory T cells in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and Behcet's disease. *J. Korean Med. Sci.* 2012; 27: 1009–13.
12. Wing K., Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 2010; 11: 7–13.
13. Rothe K., Quandt D., Schubert K., Rossol M., Klingner M., Jasinski-Bergner S., et al. Latent cytomegalovirus infection in rheumatoid arthritis and increased frequencies of cytolytic LIR-1+ CD8⁺ T cells. *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68: 337–46.
14. Tamm A., Ziegler T., Lautenschlager I., Nikkari S., Möttönen T., Luukkainen R., et al. Detection of cytomegalovirus DNA in cells from synovial fluid and peripheral blood of patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 1993; 20: 1489–93.
15. Stahl H.D., Hubner B., Seidl B., Liebert U.G., van der Heijden I.M. et al. Detection of multiple viral DNA species in synovial tissue and fluid of patients with early arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2000; 59: 342–6.
16. Pierer M., Rothe K., Quandt D., Schulz A., Rossol M., Scholz R., et al. Association of anticytomegalovirus seropositivity with more severe joint destruction and more frequent joint surgery in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 1740–9.
17. Kawashighri S.Y., Kawakami A., Okada A., Koga T., Tamai M., Yamasaki S., et al. CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}-Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 2011; 38: 2517–21.
18. Ji L., Geng Y., Zhou W., Zhang Z. A study on relationship among apoptosis rates, number of peripheral T cell subtypes and disease activity in rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 2016; 19: 167–71.
19. Blache C., Lequerre T., Roucheux A., Beutheu S., Dedreux I., Jacquot S., et al. Number and phenotype of rheumatoid arthritis patients' CD4⁺CD26^{hi} regulatory T cells are not affected by adalimumab or etanercept. *Rheumatology (Oxford)*. 2011; 50: 1814–22.
20. Sylwester A.W., Mitchell B.L., Edgar J.B., Taormina C., Pelte C., Ruchti F., et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* 2005; 202: 673–85.
21. Jost N.H., Abel S., Hutzler M., Sparwasser T., Zimmermann A., Rorer A., et al. Regulatory T cells and T-cell-derived IL-10 interfere with effective anti-cytomegalovirus immune response. *Immunol. Cell Biol.* 2014; 92: 860–71.
22. Terrazzini N., Bajwa M., Vita S., Cheek E., Thomas D., Seddiki N., et al. A novel cytomegalovirus-induced regulatory-type T-cell subset increases in size during older life and links virus-specific immunity to vascular pathology. *J. Infect. Dis.* 2014; 209: 1382–92.

Поступила 30.01.19

Принята к печати 01.02.19

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Димитрова Н.И.¹, Гасретова Т.Д.², Алутина Э.Л.², Харсеева Г.Г.²

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ БЛРС-ПРОДУЦИРУЮЩИХ И НЕ ПРОДУЦИРУЮЩИХ БЛРС ШТАММОВ *E. COLI* У БОЛЬНЫХ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

¹ФКУЗ Медико-санитарная часть МВД России по Ростовской области, 344002, Ростов-на-Дону, Россия;

²ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 344022, Ростов-на-Дону, Россия

В результате проведенных исследований показано, что 44,1% инфекций мочевыводящих путей (ИМП), вызываемых E. coli, приходится на продуцентов бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС). У 93,3% БЛРС-продуцирующих штаммов E. coli выявлена ассоциированная резистентность к фторхинолонам и ко-тримоксазолу. Все исследуемые штаммы вне зависимости от продукции БЛРС были чувствительны к имипенему, у преобладающего большинства выявлена чувствительность к эртапенему, гентамицину и резистентность к доксициклину. Не продуцирующие БЛРС штаммы E. coli были чувствительны и к фосфомицину. Сопоставление данных, полученных при тестировании выделенных культур на БЛРС, изучении их чувствительности и резистентности относительно бета-лактамов (амоксциллин/клавуланат, цефтазидим, цефтриаксон, цефотаксим, имипенем), свидетельствует о необходимости тестирования изолятов на продукцию AmpC. С этой целью при проведении скрининг-теста на БЛРС и метода «двойных дисков» наряду с цефалоспорином III поколения необходимо использовать фенотипический тест на чувствительность к цефепиму. Использование результатов тестирования изолятов E. coli, выделенных от больных с ИМП, на продукцию БЛРС, ферментов AmpC, карбапенемаз и чувствительность к антимикробным препаратам (АМП) позволит повысить эффективность антимикробной терапии (АМТ) и будет способствовать сдерживанию формирования и распространения резистентных к антимикробным препаратам штаммов.

Ключевые слова: БЛРС-продуцирующие *E. coli*; инфекции мочевыводящих путей; антимикробные препараты.

Для цитирования: Димитрова Н.И., Гасретова Т.Д., Алутина Э.Л., Харсеева Г.Г. Чувствительность и резистентность к антимикробным препаратам БЛРС-продуцирующих и не продуцирующих БЛРС штаммов *E. coli* у больных с инфекцией мочевыводящих путей. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (2): 104-110

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-104-110>

Dimitrova N.I.¹, Gasretova T.D.², Alutina E.L.², Kharseeva G.G.²

SENSITIVITY AND RESISTANCE TO ANTIMICROBIAL AGENTS ESBL-PRODUCING AND NOT PRODUCING ESBL STRAINS OF *E. COLI* IN PATIENTS WITH URINARY TRACT INFECTION

¹Federal state establishment of health care the Medical and sanitary part of the Ministry of Internal Affairs of the Russian Federation across the Rostov region, 344002, Rostov on Don, Russia;

²Federal State Educational Institution of Higher Education «Rostov State Medical University» Ministry of Health of Russia, 29, 344022, Rostov-on-Don, Russia

As a result of the conducted researches it is shown that 44.1% of urinary tract infections (UTIS) caused by E. coli are accounted for by producers of beta-lactamase of the extended spectrum of action (ESBL). Associated resistance to fluoroquinolones and co-trimoxazole was found in 93.3% of BLRS-producing E. coli strains. All studied strains regardless of ESBL production were sensitive to imipenem, the majority showed sensitivity to ertapenem, gentamicin and resistance to doxycycline. Not producing ESBL strains of E. coli were sensitive to fosfomycin. Comparison of data obtained during testing of isolated cultures on ESBL, study of their sensitivity and resistance to beta-lactams (amoxicillin/clavulanate, ceftazidime, ceftriaxone, cefotaxime, imipenem) indicates the need to test isolates for AmpC products. To this end, during the screening test for ESBL and the method of «double disks», along with cephalosporins of III generation, it is necessary to use a phenotypic test for sensitivity to cefepime. The use of test results of E. coli isolates isolated from patients with UTIS for the production of ESBL, ampC enzymes, carbapenemase and sensitivity to AMP will improve the effectiveness of antimicrobial therapy and will help to curb the formation and spread of antimicrobial-resistant strains.

Key words: ESBL-producing *E. coli*; urinary tract infection; antimicrobial agents.

For citation. Dimitrova N.I., Gasretova T.D., Alutina E.L., Kharseeva G.G. Sensitivity and resistance to antimicrobial agents ESBL-producing and not producing ESBL strains of *E. coli* in patients with urinary tract infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (2): 104-110 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-104-110>

For correspondence: Gasretova T. D., associate professor of the Department of Microbiology and Virology No. 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Information about authors:

Dimitrova N. I. <https://orcid.org/0000-0003-0624-1158>

Gasretova T. D. <https://orcid.org/0000-0002-9191-0848>

Alutina E. L., <https://orcid.org/0000-0001-6968-0583>

Kharseeva G. G., <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

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

Received 07.12.2018

Accepted 21.12.2018

Введение. Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) – циститы, уретриты, пиелонефриты остаются распространенными инфекционными заболеваниями, могут осложняться формированием уросепсиса и других осложненных форм. Основным возбудителем ИМП является *E. coli*, менее часто от больных выделяют других представителей сем. *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus spp.*, *S. saprophyticus* и др. [1, 2].

Широкое распространение во всем мире нашли бета-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС) – продуцирующие штаммы энтеробактерий, наиболее часто их выявляют при нозокомиальных инфекциях. С 2000 г. БЛРС-продуцирующие энтеробактерии выделяют от больных при внебольничных инфекциях, обнаруживают у здоровых носителей, больных и здоровых животных, в пищевых продуктах. Основными продуцентами БЛРС являются *E. coli* и *K. pneumoniae*. Распространенность БЛРС-продуцирующих микроорганизмов зависит от ряда факторов (биологический вид, географическое расположение, тип стационара и отделения, контроль за качеством проведения эпидемических мероприятий в лечебно-профилактических учреждениях, форма инфекции, нерациональная антимикробная терапия (АМТ), длительное использование антимикробных препаратов (АМП) и др. [3-5].

В настоящее время актуальной проблемой является снижение эффективности цефалоспоринов III-IV поколения, обусловленное продукцией БЛРС и других бета-лактамаз, что предполагает использование эффективных препаратов при проведении АМТ инфекций, вызываемых продуцентами бета-лактамаз. У продуцентов БЛРС наблюдается снижение чувствительности и к препаратам других групп, выявлена ассоциированная резистентность к фторхинолонам и ко-тримоксазолу [3, 6, 7].

Этим объясняется актуальность изучения роли БЛРС-продуцирующих *E. coli* в этиологической структуре ИМП и изучение их чувствительности к АМП различных групп.

Цель – сравнительное изучение чувствительности и резистентности БЛРС-продуцирующих и не продуцирующих БЛРС штаммов *E. coli*, выделенных от больных с инфекцией мочевыводящих путей, к АМП.

Материал и методы. Исследовано 216 проб мочи от обследуемых и пациентов с клиническими диагнозами: острый и хронический цистит, острый

и хронический пиелонефрит, мочекаменная болезнь, цистостомия, доброкачественная гиперплазия предстательной железы.

С целью установления этиологии заболевания посева мочи осуществляли методом секторных посевов. В представленном исследовании критерием этиологической значимости возбудителя, выделенного из мочи, был показатель $\geq 10^5$ КОЕ/мл (Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: Приказ МЗ СССР № 535. М., 1985). Для идентификации микроорганизмов использовали микротест-системы ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России.

Чувствительность штаммов *E. coli* к АМП определяли диско-диффузионным методом. Выделенные от больных культуры *E. coli* были тестированы на чувствительность к следующим препаратам: бета-лактамам (ампициллин, амоксициллин-клавуланат, цефтазидим, цефтриаксон, цефотаксим, имипенем, эртапенем), фторхинолонам (ципрофлоксацин, норфлоксацин), доксицилину, аминогликозидам (гентамицин, амикацин), ко-тримоксазолу, фосфомицину, фурадонину.

Выявление БЛРС-продуцирующих штаммов проводили с использованием скрининг-теста по чувствительности к цефтазидиму, цефтриаксону, цефотаксиму. Продукцию БЛРС подтверждали методом «двойных дисков» по синергизму действия относительно БЛРС-продуцирующих штаммов амоксициллин/клавуланата и цефалоспоринов III поколения (цефтазидим, цефотаксим, цефтриаксон) (Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания МУК 4.2.1890-04. М.; 2004.) [4, 9].

Для оценки достоверности полученных результатов использовали метод «критерий знаков» [8].

Результаты. В течение 2017 года от 216 пациентов было выделено 45 штаммов микроорганизмов различных видов, что составило 20,8% от общего количества исследованных проб мочи. В этиологической структуре ИМП удельный вес *E. coli* составил 75,6% (34 штамма). Штаммы *E. coli* были выделены от больных с клиническими диагнозами: острый цистит (2 шт.), хронический цистит (2 шт.), острый пиелонефрит (3 шт.), хронический пиелонефрит (22 шт.) мочекаменная болезнь (5 шт.). Другие патогены в этиологической структуре ИМП составили 24,5% (11 шт.), из

Таблица 1

Этиологическая структура ИМП по результатам исследования

Вид	Количество штаммов (абс., %)
<i>E. coli</i>	34 (75,6 %)
<i>S. epidermidis</i>	4 (8,9 %)
<i>P. aeruginosa</i>	4 (8,9 %)
<i>P. mirabilis</i>	2 (4,5 %)
<i>S. pyogenes</i>	1 (2,2 %)
Всего	45

Таблица 2

Результаты тестирования штаммов *E. coli* на продукцию БЛРС

Тест	Количество исследованных штаммов (абс)	Количество положительных результатов теста (абс/%)
Скрининг-тест на БЛРС	34	19 (55,9%)
Тест, подтверждающий продукцию БЛРС - метод «двойных дисков»	34	15 (44,1 %)

Таблица 3

Показатели обнаружения БЛРС-продуцирующих и не продуцирующих БЛРС штаммов *E. coli* у больных с различным клиническим диагнозом

Клинический диагноз	БЛРС+	БЛРС-
Острый цистит	-	2
Острый пиелонефрит	-	3
Хронический цистит	1	1
Хронический пиелонефрит	14	8
Мочекаменная болезнь	-	5
Всего	15	19

них *P. mirabilis* – 2 штамма, *S. pyogenes* – 1 штамм были выделены от больных с острым и хроническим пиелонефритом, штаммы *P. aeruginosa* были выявлены у двух больных с хроническим пиелонефритом, одного больного с цистостомией и одного больного с доброкачественной гиперплазией предстательной железы. *S. epidermidis* (4 шт.) были выявлены у двух больных с хроническим пиелонефритом, у одного больного с острым циститом и одного больного с мочекаменной болезнью (табл. 1).

С целью выявления БЛРС-продуцирующих *E. coli* все изоляты были тестированы на чувствительность к цефтазидиму, цефтриаксону и цефотаксиму. В скрининг-тесте была выявлена резистентность к цефтазидиму у 16 штаммов, к цефотаксиму – 15, цефтриаксону – 14. При этом для многих штаммов была характерна ассоциированная резистентность к трем или двум из этих препаратов. Сопоставление результатов скрининг-теста позволило выявить БЛРС-продуцию у 19 штаммов *E. coli*. Для подтверждения результатов скрининг-теста все выделенные от больных штаммы исследовали, используя

метод «двойных дисков». Синергизм действия амоксициллин/клавуланата и цефтазидима, цефотаксима и цефтриаксона был выявлен только у 15 из 34 штаммов. Таким образом, в этиологической структуре ИМП БЛРС-продуцирующие штаммы составили 44,1% (15 штаммов) от общего количества выделенных штаммов *E. coli* (табл. 2).

У 4-х из 19 штаммов продукция БЛРС не была подтверждена, что могло быть обусловлено присутствием других бета-лактамаз, маскирующих синергизм, таких как карбапенемазы, бета-лактамазы AmpC, бета-лактамазы класса D. У энтеробактерий обнаружена и одновременная продукция бета-лактамаз разного типа. Карбапенемазы и бета-лактамазы AmpC проявляют устойчивость к клавулановой кислоте, БЛРС класса D (типа ОХА) плохо ингибируются клавулановой кислотой [4, 9, 10]. При этом ни у одного из 19 штаммов, проявивших резистентность к цефалоспорином III поколения (цефтазидим, цефотаксим, цефтриаксон), не обнаружена устойчивость к имипенему в скрининг-тесте с имипенемом и выявлен один штамм резистентный к эртапенему среди не продуцирующих БЛРС штаммов. Однако, скрининг-тест на продукцию карбапенемаз с эртапенемом, несмотря на высокую чувствительность, обладает низкой специфичностью [4]. В настоящее время БЛРС класса D (типа ОХА) у энтеробактерий встречаются чрезвычайно редко. Возможно, отрицательные результаты, выявленные у 4-х штаммов, исследованных с использованием подтверждающего теста на БЛРС, были обусловлены продукцией этими штаммами ферментов AmpC.

Следует отметить, что все продуценты БЛРС были выявлены у больных с хроническими патологиями мочевыводящих путей, тогда как не продуцирующие БЛРС штаммы обнаружены, как при острых, так и хронических инфекциях (табл. 3).

Значительный интерес представляет сравнительное изучение чувствительности БЛРС-положительных и БЛРС-отрицательных изолятов к АМП различных групп (табл. 4, рис.1). Все штаммы, как БЛРС-положительные, так и БЛРС-отрицательные, были чувствительны к имипенему, у преобладающего большинства тестируемых штаммов выявлена чувствительность к эртапенему (93,3% и 94,7%) и гентамицину (92,9% и 78,9%).

В группе БЛРС-отрицательных 15 (88,2%) штаммов были чувствительны к фосфомицину, показатели чувствительности этих штаммов к другим препаратам были значительно меньше: ампициллину – 21,4%, амоксициллин-клавуланату – 63,2% и цефалоспорином III поколения (цефтазидим, цефотаксим, цефтриаксон) – 52,6-68,4%, фторхинолонам (ципрофлоксацин, норфлоксацин) – 63,2-68,4% и 47,4% ко-тримоксазолу. К фурадонину выявлена чувствительность всего у нескольких штаммов обеих групп.

При сравнительном анализе спектра резистентности была выявлена ассоциированная резистентность у большинства БЛРС-продуцирующих штаммов к фторхинолонам и ко-тримоксазолу. Количество изолятов, устойчивых к фторхинолонам (ципрофлоксацин, норфлоксацин) и ко-тримоксазолу в группе

Таблица 4

Распределение БЛРС-продуцирующих и не продуцирующих БЛРС штаммов *E. coli* по чувствительности и резистентности к АМП

Наименование препаратов	БЛРС +					БЛРС -				
	Количество штаммов	Ч		Р		Количество штаммов	Ч		Р	
		абс. (%)	Критерий достоверности	абс (%)	Критерий достоверности		абс (%)	Критерий достоверности	абс (%)	Критерий достоверности
Ампициллин	*	*	*	*	*	19	4 (21,4%)	-	11 (57,9%)	-
Цефтазидим	15	0	*	12 (80%)	+	15	10 (66,7%)	-	4 (26,7%)	-
Цефотаксим	15	0	*	13 (86,6%)	++	19	10 (52,6%)	-	2 (10,5%)	-
Цефтриаксон	15	0	*	12 (80%)	+	19	13 (68,4%)	-	2 (10,5%)	-
Амоксициллин/клавуланат	*	*	*	*	*	19	12 (63,2%)	-	3 (15,8%)	-
Имипенем	15	15 (100%)	++	0	*	19	19 (100%)	++	0	*
Эртапенем	15	14 (93,3%)	++	0	*	19	18 (94,7%)	++	1 (5,3%)	-
Гентамицин	14	13 (92,9%)	++	1 (7,1%)	-	19	15 (78,9%)	+	3 (15,8%)	-
Амикацин	15	9 (60%)	-	3 (20%)	-	19	12 (63,2%)	-	2 (10,5%)	-
Доксициклин	15	0	*	14 (93,3%)	++	18	2 (11,1%)	-	15 (83,3%)	++
Ципрофлоксацин	15	1(6,7%)	-	14 (93,3%)	++	19	13 (68,4%)	-	6 (31,6%)	-
Норфлоксацин	15	1(6,7%)	-	14 (93,3%)	++	19	12 (63,2%)	-	7 (36,8%)	-
Ко-тримоксазол	15	1(6,7%)	-	14 (93,3%)	++	19	9 (47,4%)	-	9 (47,4%)	-
Фосфомицин	15	10 (66,7%)	-	4 (26,7%)	-	17	15 (88,2%)	++	2 (11,8%)	-
Фурадонин	13	5 (38,5%)	-	5 (38,5%)	-	14	3 (21,4%)	-	5 (35,7%)	-

Примечание: «Ч» - чувствительные; «Р» - резистентные; «*» - не проводилось исследование; «-» - не достоверно; «+» - достоверно с вероятностью 95,0-97,5%; «++» - достоверно с вероятностью 99,0-99,5%.

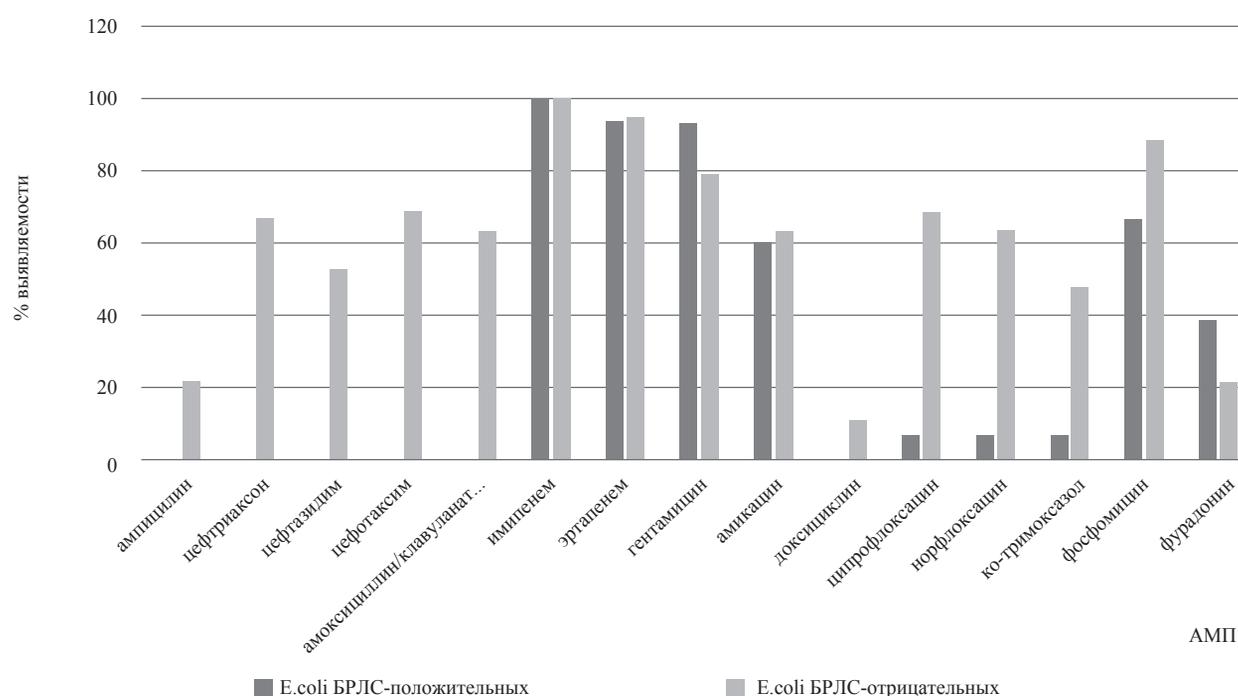


Рис. 1. Показатели чувствительности БЛРС-продуцирующих и не продуцирующих БЛРС-штаммов *E. coli* к АМП (%).

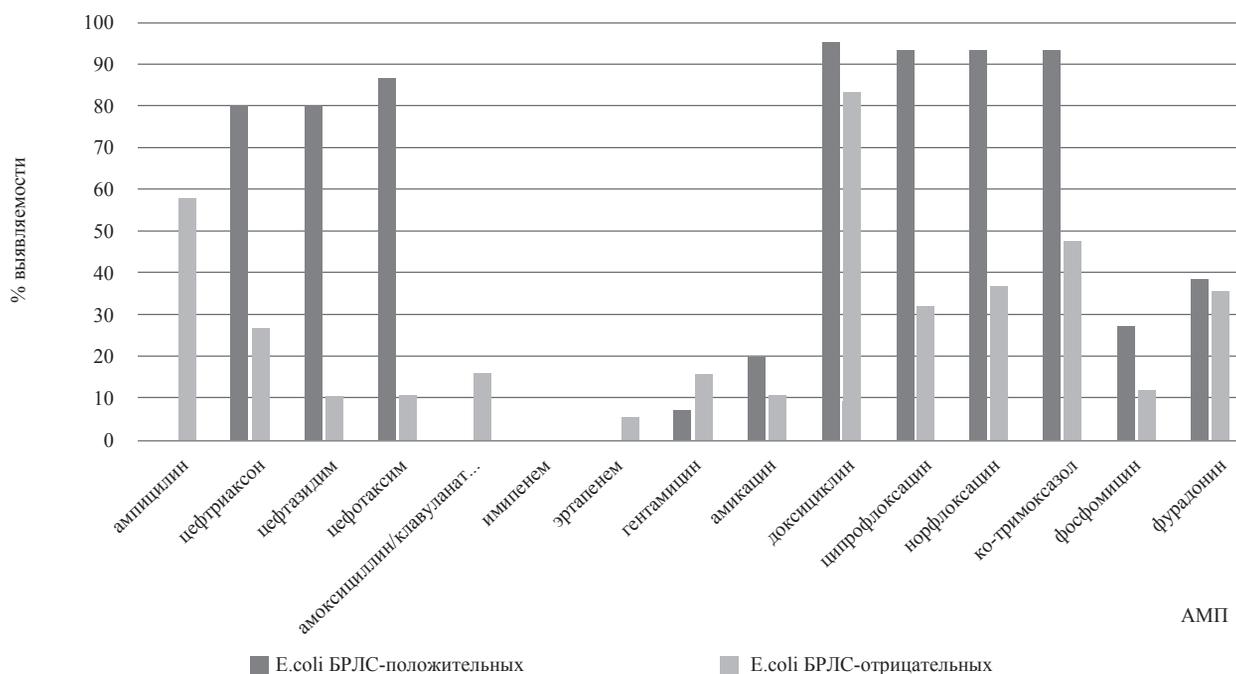


Рис. 2. Показатели резистентности БРЛС-продуцирующих и не продуцирующих БРЛС штаммов *E. coli* к АМП (%).

БРЛС-продуцирующих, составило 93,3% по каждому препарату. По данным ряда авторов ассоциированная резистентность к фторхинолонам и ко-тримоксазолу характерна для БРЛС-продуцентов *E. coli* и обнаруживается у большинства штаммов [6, 7].

В группе изолятов, не продуцирующих БРЛС, выявлена резистентность к ципрофлоксацину у 31,6% штаммов, норфлоксацину - 36,6% и ко-тримоксазолу - 47,4% (табл. 4, рис.2). В настоящее время штаммы энтеробактерий, устойчивые к ципрофлоксацину, оцениваются как резистентные ко всем другим фторхинолонам [11].

Преобладающее большинство БРЛС-продуцирующих и не продуцирующих БРЛС штаммов были устойчивы к доксициклину.

Известно, что бета-лактамазы широкого спектра действия и большинство бета-лактамаз расширенного спектра действия ингибирует клавулановая кислота (Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания МУК 4.2.1890-04. – М., 2004. – 91 с.) [3, 4]. Бета-лактамазы AmpC, БРЛС класса D и карбапенемазы устойчивы к клавулановой кислоте. Однако, обращает на себя внимание факт, что в группе БРЛС-отрицательных *E. coli*, в которую были включены изоляты на основании результатов тестирования на БРЛС, чувствительные к амоксициллин-клавуланату штаммы составили всего 63,2%, к цефотаксиму – 52,6%, цефтриаксону - 68,7%, цефтазидиму – 66,2% и у некоторых штаммов была выявлена резистентность к этим препаратам (табл. 4, рис. 1, 2). При этом из 4-х штаммов, которые по результатам скрининг-теста были отнесены к БРЛС-

продуцирующим, продукция этих бета-лактамаз при постановке подтверждающего теста не была подтверждена, у 3-х штаммов выявлена резистентность к амоксициллин/клавуланату.

Обсуждение. Успешное лечение ИМП связано с ограничением селекции и распространения, резистентных к АМП штаммов *E. coli*. Селекции, формирования и распространению резистентных штаммов способствует нерациональная АМП [12]. Нерациональная АМП может определяться использованием АМП, к которым циркулирующие штаммы проявляют устойчивость, а также применением в лабораторной практике ограниченного набора тестов и методов, что не позволяет своевременно выявлять БРЛС, гиперпродукцию БРЛС, бета-лактамазы AmpC, карбапенемазы и, соответственно, выбрать эффективные препараты для АМП.

Для решения проблем, связанных с формированием и распространением резистентных к АМП штаммов *E. coli*, необходимо использовать комплексный подход.

Показано, что в этиологической структуре ИМП, вызываемых *E. coli*, БРЛС-продуцирующие штаммы составляют 44,1%.

Большинство БРЛС являются приобретенными ферментами, экспрессию которых преимущественно кодируют гены, расположенные на плазидах и реже на хромосомной ДНК. Для БРЛС характерно разнообразие фенотипов, различный уровень экспрессии и активности относительно различных бета-лактамов, мутации генов, кодирующих продукцию бета-лактамаз могут приводить к депрессии или гиперпродукции ферментов [4]. В результате проведенного исследо-

вания у нескольких БЛРС-отрицательных штаммов была выявлена резистентность к амоксициллин-клавуланату и цефалоспорином III поколения, что могло быть обусловлено гиперпродукцией БЛРС или продукцией ферментов AmpC. При определенных условиях продукция ферментов AmpC может возрастать. Длительная терапия цефалоспоринами является одним из факторов риска формирования продуцентов бета-лактамаз AmpC [4, 13, 14]. С целью выявления гиперпродукции бета-лактамаз, ферментов AmpC необходимо при проведении скрининг-теста на БЛРС и метода «двойных дисков» наряду с цефалоспоринами III поколения использовать цефепим. Чувствительность к цефепиму является дополнительным фенотипическим показателем продукции AmpC. Цефепим – цефалоспорин IV поколения не подвергается гидролизу при воздействии бета-лактамаз AmpC. Для подтверждения продукции AmpC рекомендуют использовать методы и тесты, основанные на ингибирующем действии бороновых кислот, их производных и клоксациллина на эти ферменты [4, 15]. Продуценты бета-лактамаз AmpC проявляют чувствительность к таким бета-лактамам, как цефепим, монобактам и карбапенемы.

Имипенем был активен относительно всех тестируемых штаммов *E. coli* и почти все штаммы были чувствительны к эртапенему и гентамицину, не продуцирующие БЛРС и к фосфомицину.

Результаты исследований свидетельствуют, что для всех штаммов *E. coli*, выделенных от больных с ИМП, характерна резистентность к доксициклину.

Для штаммов *E. coli*, продуцирующих БЛРС, показаны высокие показатели ассоциированной резистентности к фторхинолонам и ко-тримоксазолу. Среди БЛРС-продуцентов, выделенных от больных с ИМП, ассоциированная резистентность к фторхинолонам выявлена более чем у 93% штаммов.

Заключение. Результаты сравнительного изучения чувствительности и резистентности БЛРС-продуцирующих и не продуцирующих БЛРС штаммов *E. coli* могут быть использованы при выборе АМП для проведения антибактериальной терапии ИМП, кроме того они свидетельствуют о необходимости более активного внедрения в лабораторную практику методов и тестов, позволяющих дифференцировать БЛРС и бета-лактамазы AmpC. Использование результатов такого тестирования позволит повысить эффективность АМП и будет способствовать сдерживанию формирования и распространения резистентных к АМП штаммов *E. coli*.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лагун Л.В. Бета-лактамазы расширенного спектра действия и их значение в формировании устойчивости возбудителей инфекций мочевыводящих путей к антибактериальным препаратам. Проблемы здоровья и экологии. 2012; 3 (33): 82-8.
2. Палагин И.С., Сухорукова М.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В., Шевелев А.В., Гринев А.В. и др. Современное состоя-

- ние антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты исследования «ДАРМИС» (2010–2011). Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012; 14 (4): 28-32.
3. Страчунский Л.С. β-лактамазы расширенного спектра – быстро растущая и плохо осознаваемая угроза. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005; 7 (1/1): 92-6.
4. Руководство EUCAST по выявлению механизмов резистентности и резистентности, имеющей особое клиническое и/или эпидемиологическое значение. Редакция 1.0 Декабрь 2013 г. Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/eucast-guideline-on-detection-of-resistance-mechanisms-1.0-rus.pdf>. Open Element.
5. Козлов Р.С. Селекция резистентных микроорганизмов при использовании антимикробных препаратов: концепция «параллельного ущерба». Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010; 12 (4): 284-92.
6. Эйдельштейн М.В., Страчунский Л.С. Динамика распространенности и чувствительности БЛРС-продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005; 7 (4): 323-36.
7. Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Кречикова О.И., Сухорукова О.В., Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В. и др. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2008; 10 (2): 163-79.
8. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. М.: Государственное издательство медицинской литературы; 1962.
9. Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A. Plasmid-determined Amc-type β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 1-11.
10. Beceiro A., Bou G., Class C β-lactamases: an increasing problem worldwide. Rev. Med. Microbiol. 2004; 15: 141-52.
11. Park Y.S., Yoo S., Seo M.R., Kim J.Y., Cho Y.K., Pai H. Risk factors and clinical features of infections caused by plasmid-mediated AmpC β-lactamases-producing Enterobacteriaceae. Int. J. Antimicrob. Agents. 2009; 34: 38-43.
12. Гасретова Т.Д., Синькова О.Н., Харсеева Г.Г., Миронов А.Ю. Формирование и распространение MRSA-штаммов у больных с гнойно-воспалительными заболеваниями. Клиническая лабораторная диагностика. 2013; 4: 33-6.
13. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации. Версия-2018-03. Available at: <http://www.iacmac.ru/minzdrav/files/docs/clrecdsma2018.pdf>. Open Element.
14. Миронов А.Ю., Крапивина И.В., Мудрак Д.Е., Иванов Д.В. Молекулярные механизмы резистентности к β-лактамам патогенов внутрибольничных инфекций. Клиническая лабораторная диагностика. 2012; 1: 39-43.
15. Поляк М.С. Бета-лактамазы: их определение как фактор повышения эффективности антибиотикотерапии. Доступно: http://mspolyak.narod.ru/books/laboratory_support_ch3.pdf. Открытый элемент.

REFERENCES

1. Lagun L.V. Extended-spectrum beta-lactamases and their significance in the formation of resistance of urinary tract infections to antibacterial agents. Problemy zdorov'ja i ekologii. 2012; 3 (33): 82-8. (in Russian)
2. Palagin I.S., Sukhorukova M.V., Dekhnic A.V., Eidelshstein M.V., Shevelev A.V., Grinev A.V., et al. Current state of antibiotic resistance of pathogens of community-acquired urinary tract infections in Russia: results of the "DARMIS" study (2010-2011). Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2012; 14 (4): 28-32. (in Russian)
3. Strachunskiy L.S. ESBL - a rapidly growing and poorly understood threat. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya. 2005; 7 (1/1): 92-6. (in Russian)

4. EUCAST guidelines for the identification of resistance and resistance mechanisms of particular clinical and/or epidemiological significance. Revision 1.0 December 2013. Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/eucast-guideline-on-detection-of-resistance-mechanisms-1.0-rus.pdf>. Open Element. (in Russian)
5. Kozlov R.S. Selection of resistant organisms with the use of antimicrobial agents: the concept of "concurrent damages". *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2010; 12 (4): 284-92. (in Russian)
6. Edelshtein M.V., Strachunskiy L.S. Dynamics of prevalence and the sensitivity of ESBL-producing enterobacteria strains to various antimicrobial agents in ICUS in Russia. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2005; 7 (4): 323-36. (in Russian)
7. Reshedko G.K., Ryabkova E.L., Krechikova O.I., Suhorukova O.V., Shevchenko O.V., Edelshtein M.V., et al. Resistance to antibiotics of gram-negative causative agents of nosocomial infections in the ICU of multidisciplinary hospitals in Russia. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2008; 10 (2): 163-79. (in Russian)
8. Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. Statistical methods in microbiological studies (Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh). Moscow: Gosudarstvennoe izdatel'stvo meditsinskoj literatury; 1962. (in Russian)
9. Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A. Plasmid-determined Amc-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 1-11.
10. Beceiro A., Bou G., Class C β -lactamases: an increasing problem worldwide. *Rev. Med. Microbiol.* 2004; 15: 141-52.
11. Park Y.S., Yoo S., Seo M.R., Kim J.Y., Cho Y.K., Pai H. Risk factors and clinical features of infections caused by plasmid-mediated AmpC β -lactamases-producing Enterobacteriaceae. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009; 34: 38-43.
12. Gasretova T. D., Sinkova O. N., Kharseeva G. G., Mironov A.Ju. Formation and distribution of MRSA-strains in patients with purulent inflammatory diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 4: 33-6.
13. Determination of microorganism sensitivity to antimicrobial agents: clinical recommendations. Version-2018-03. Available at: <http://www.iacmac.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf>. Open Element. (in Russian)
14. Mironov A.Ju., Krapivina I.V., Mudrak D.E., Ivanov D.V. Molecular mechanisms of resistance to β -lactams of nosocomial infection pathogens. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 2: 39-43. (in Russian)
15. Polyak M.S. Beta-lactamases: their definition as a factor of improving the effectiveness of antibiotic therapy. Available at: http://mspolyak.narod.ru/books/laboratory_support_ch3.pdf. Open Element. (in Russian)

Поступила 07.12.18

Принята к печати 21.12.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Годовалов А.П.¹, Даниелян Т.Ю.², Карпунина Т.И.¹

ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ, ОБЛАДАЮЩИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТЬЮ В ГИНЕКОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, Пермь, Российская Федерация;

²ООО «Медицинская студия», 614990, Пермь, Российская Федерация

*В настоящее время при наличии широких диагностических возможностей лабораторная диагностика нарушения микроэкологического состояния вагинального биотопа зачастую ограничивается клиническими данными, результатами микроскопических исследований и применением культурального метода. Однако, при таком комплексе нельзя получить ответ о функциональной активности микроорганизмов. Цель исследования – оценить информативность сочетанного изучения параметров роста и способности продуцировать молочную кислоту клиническими штаммами *Lactobacillus spp.* для характеристики состояния микроэкологии цервикально-вагинального биотопа. Изучали кинетику роста штаммов лактобактерий, изолированных из отделяемого заднего свода влагалища. Концентрацию молочной кислоты в среде определяли при помощи набора «Молочная кислота – Ольвекс» (Россия). Пробы отбирали через каждые 12 часов культивирования. Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики, *t*-критерия Стьюдента. Показано, что 44% штаммов *Lactobacillus spp.* к 72 часу культивирования не достигали фазы экспоненциального роста. Остальные штаммы с 12-24 часа переходили в фазу экспоненциального роста. По продукции молочной кислоты штаммы, находящиеся в лаг-фазе, не отличались друг от друга, поскольку практически не синтезировали этот метаболит. Среди остальных штаммов, находящихся в фазе экспоненциального роста, одни – не продуцировали молочную кислоту, другие с каждым часом наращивали продукцию лактата. Часть штаммов к 36 часу вышла на пик продукции кислоты и к 72 ч наблюдался некоторый спад синтетической активности. Показано, что для большинства вагинальных штаммов *Lactobacillus spp.* характерна вариабельность длительности периода адаптации и уровня функциональной активности. Кроме этого, лишь небольшое число клинических штаммов продуцировали молочную кислоту через 24 ч от начала культивирования. Следовательно, для адекватной оценки микроэкологического статуса вагинального биотопа недостаточно проведения микроскопического изучения как нативного материала, так и культур, изолируемых на специальных питательных средах. Представляется, что, наряду с использованием современных методов генетического анализа, определение *in vitro* ростовых характеристик, в первую очередь продолжительности лаг-фазы, и продукции лактата штаммами молочнокислых бактерий сможет прояснить многие вопросы, связанные с формированием дисбиотических состояний, в частности в вагинальном биотопе, а также послужит повышению эффективности назначаемого при этом лечения.*

Ключевые слова: *Lactobacillus spp.*; кинетика роста; молочная кислота; микроэкология.

Для цитирования: Годовалов А.П., Даниелян Т.Ю., Карпунина Т.И. Характеристики штаммов лактобактерий, обладающие диагностической значимостью в гинекологической практике. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (2): 111-116. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-111-116>

Godovalov A.P.¹, Danielyan T.Yu.², Karpunina T.I.¹

CHARACTERISTICS OF LACTOBACTERIA STRAINS, HAVING DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE IN GYNECOLOGICAL PRACTICE

¹Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner, Russian Ministry of Health, 614990, Perm, Russian Federation;

²LLC "Medical Studio", Perm, 614990, Russian Federation

*Nowadays, in the presence of wide diagnostic possibilities, laboratory diagnostics of microecological disorders of vaginal biotope are often limited to clinical data, microscopic examination results and the use of a culture method. However, with such a complex it is impossible to get an answer about the functional activity of microorganisms. The aim of investigation was to evaluate the information content of a combined study of growth parameters and the ability to produce lactic acid by clinical strains of *Lactobacillus spp.* to characterize the state of the microecology of the cervical-vaginal biotope. Materials and methods. Studied the growth kinetics of strains of lactobacilli isolated from the detachable posterior vaginal fornix. The concentration of lactic acid in the medium was determined using the "Lactic Acid – Olvex" kit (Russia). Samples were taken every 12 hours of cultivation. Statistical analysis of the results was performed using the methods of descriptive statistics, Student's *t*-test. Results. It has been shown that 44% of *Lactobacillus spp.* to 72 hours of cultivation did not reach the phase of exponential growth. The remaining strains from 12-24 hours passed into the phase of exponential growth. In the production of lactic acid, the strains that are in the lag-phase did not differ from each other, since they practically did not synthesize this metabolite. Among the remaining strains that are in the phase of exponential growth, some did not produce lactic acid, others increased their lactate production every hour. Part of the strains reached the peak of acid production by 36 hours and by 72 hours some decrease in synthetic activity was observed. Conclusion. It has been shown that for most vaginal strains of *Lactobacillus spp.* characteristic variability of the duration of the adaptation period and the level of functional activity. In addition, only a small number of clinical strains produced lactic acid 24 hours after the start of cultivation. Therefore, to adequately assess the microecological status of the vaginal biotope, microscopic examination of both native material and cultures isolated on special nutrient media is not enough. It seems that, along with the use of modern methods of genetic analysis, the determination of *in vitro* growth characteristics, primarily lag-phase duration, and*

Для корреспонденции: Годовалов Анатолий Петрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ, доц. каф. микробиологии и вирусологии; e-mail: AGodovalov@gmail.com

lactate production by lactic acid bacteria strains can clarify many issues related to the formation of dysbiotic states, in particular, in the vaginal biotope, and will also serve to increase the effectiveness of the prescribed treatment.

Key words: *Lactobacillus spp.*; growth kinetics; lactic acid; microecology.

For citation: Godovalov A.P., Danielyan T.Yu., Karpunina T.I. Characteristics of lactobacteria strains, having diagnostic significance in gynecological practice. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (2): 111-116 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-111-116>

For correspondence: Godovalov A.P., Candidate of Medical Sciences, lead researcher of the Central scientific laboratory, Associate Professor of Microbiology and Virology Department, e-mail: AGodovalov@gmail.com

Information about authors:

Godovalov A.P., <http://orcid.org/0000-0002-5112-2003>

Karpunina T.I., <http://orcid.org/0000-0003-2511-4656>

Acknowledgment. *The reported study was funded by RFBR and Perm Region according to the research projects №16-44-590429 p_a and 17-44-590404 p_a.*

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

Received 11.12.2018
Accepted 21.12.2018

Введение. Организм человека и его микрофлора тесно связаны друг с другом и находятся в динамическом равновесии, являясь единой экологической системой. Разные области тела человека имеют характерную микрофлору, которая отличается по своему качественному и количественному составу, зависящему от действия многочисленных, зачастую не связанных между собой факторов. Эндогенная микрофлора биотопов мочеполовой системы женщины неоднородна и переменчива, однако в составе вагинально-цервикальной микробиоты в норме безоговорочно признается доминирующая роль молочно-кислых бактерий [1-3]. Такое представление бытует с конца XIX века, когда в медицинскую практику внедрили световую микроскопию. В 1892 г. Albert Döderlein [4] в диссертационной работе на тему «Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber» («Вагинальный секрет и его значение для родильной горячки») сравнил микробный пейзаж влагалища здоровых женщин и родильниц с послеродовыми эндометритами. В работе были впервые опубликованы рисунки бактерий, преобладавших в нормоценозе, которые впоследствии назвали палочками Додерлейна, а в настоящее время объединяют под общим названием *Lactobacillus spp.* На протяжении следующего столетия критерии микроскопической оценки микробиоты влагалища дополнялись и модифицировались [5]. Так, стали учитывать не только морфотипы бактерий вагинального секрета, но и лейкоцитарную реакцию, и количество эпителиальных клеток. Позднее R.Cruickshank и A. Sharman [6] стали использовать кроме микроскопических данных водородный показатель (рН). Было установлено, что обнаружение лактобактерий ассоциировалось с более низкими показателями рН. R.Nugent et al. [7], взяв за основу критерии Spiegel, разработали метод оценки микробиоты влагалища для диагностики бактериального вагиноза, который основан на балльной оценке соотношения трех морфотипов бактерий, а именно *Lactobacillus* (грамположительные крупные палочки), *Gardnerella/Bacteroides* (грамвариабельные или грамотрицательные мелкие палочки) и *Mobiluncus* (изогнутые грамотрицательные бактерии) в препара-

тах отделяемого слизистой влагалища, окрашенных по Граму. Баллы присваиваются в соответствии с количеством каждого из трех морфотипов, которое оценивается аналогично методу С.Spiegel [8].

Широкое внедрение культуральных методов исследования значительно расширило представления о норме и патологии, сделав во многих случаях результаты бактериологического анализа «золотым стандартом» лабораторной диагностики [9]. Однако ограничения такого подхода, особенно при выделении и идентификации трудно культивируемых или некультивируемых микроорганизмов, в том числе и разных видов лактобацилл, не позволяли разработать унифицированные рекомендации для оценки состояния вагинально-цервикального биотопа. До последнего времени при обследовании женщин в результатах анализов преобладает обобщающая, но мало информативная характеристика молочнокислых бактерий: количество *Lactobacillus spp.* [10]. Причем, ее по-прежнему получают с помощью микроскопии мазков из исследуемого материала, окрашенных по Граму, либо по бактериоскопической оценке изолятов, растущих на молочно-ростовой среде, засеянной из его соответствующего разведения [9]. Между тем, в последние десятилетия накапливается информация о том, что в микробиоте влагалища может встречаться более десятка видов лактобактерий, количественное содержание, состав и функциональное состояние представителей которых постоянно изменяется в зависимости от возраста, гормонального статуса, периода менструального цикла и других факторов. Более того, эти параметры в значительной степени определяют эубиоз либо дисбиоз в этой экологической нише [11]. Совершенствование методов лабораторной диагностики, в частности, внедрение молекулярно-генетического анализа, существенно продвинуло результативность исследований по расшифровке видового спектра микрофлоры нижних отделов генитального тракта [1, 12]. Согласно современным представлениям, решающая роль в формирующемся микробиотическом состоянии влагалища отводится представителю 5 видов лактобактерий: *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. vaginalis* и *L. iners*

[13, 14]. С другой стороны, в последнее время зачастую наблюдается клиническое состояние, когда происходит драматическое увеличение как разнообразия видов микроорганизмов, так и микробной нагрузки, именуемое бактериальным вагинозом (БВ). В подобных случаях доминантной микрофлорой становятся *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp. и *Porphyromonas* spp., а также *Mycoplasma hominis*, виды *Mobiluncus*, *Atopobium vaginae* [15, 16]. В то же время показана возможность развития БВ даже при достаточном, а иногда и избыточном количестве, например, *L. crispatus* [17]. Становится очевидным, что не только, а скорее не столько, численность и видовой спектр *Lactobacillus* определяют благополучие в исследуемом биотопе. Общеизвестно, что детектируемые виды лактобактерий отличаются по устойчивости к различным факторам и способности поддерживать колонизационную резистентность влагалища [18]. В многочисленных исследованиях показано, что лактофлора обладает выраженной бактериоциногенной активностью, что позволяет ей реализовывать антагонистический потенциал по отношению к условно патогенным микроорганизмам (УПМ) [1], хотя эффективность такого антагонизма варьирует в широких пределах: от опосредованной лактобактериями гибели до изменения ряда свойств УПМ. Так, например, метаболиты некоторых *Lactobacillus* способны подавлять каталазную активность стафилококков. Ключевую роль в этом играют лизоцимоподобные ферменты и бактериоцины [19].

Среди широкого набора факторов, обеспечивающих антагонистическую активность лактобактерий, авторы выделяют продукцию молочной кислоты и перекиси водорода [20]. Роль пероксида в обеспечении протекции вагинального биотопа от заселения БВ-ассоциированными видами некоторыми авторами ставится под сомнение, поскольку показано, что штаммы, не продуцирующие H_2O_2 , в том числе *L. crispatus*, способны выполнять протективную роль [18]. В результате можно полагать, что определение синтеза только этого метаболита представляется не совсем оправданным, а роль его в обеспечении антагонистической активности кажется преувеличенной. Это обусловлено рядом причин. Так, гипоксическое состояние вагины исключает продукцию H_2O_2 микроорганизмами. Для цервикальной жидкости характерна высокая антиоксидантная способность, которая нивелирует микробицидную активность образовавшейся перекиси. Кроме этого, показано, что H_2O_2 более токсичен для вагинальных лактобактерий, чем для 17 видов микроорганизмов, ассоциированных с развитием БВ [21]. В многочисленных исследованиях [21-23] решающее значение в подавлении условно патогенной микрофлоры отводится способности лактобактерий продуцировать молочную кислоту. Продукция метаболита не зависит от гипоксического состояния биотопа. Компоненты цервикальной жидкости не блокируют микробицидную активность лактата в отношении большинства БВ-ассоциированных микроорганизмов. В свою очередь молочная кислота не оказывает повреждающего действия на представителей рода *Lactobacillus* [21]. Уста-

новлено, что продукция молочной кислоты зависит от концентрации CO_2 и многие виды лактобактерий при снижении концентрации CO_2 , например, в условиях атмосферного воздуха, переходят на продукцию уксусной кислоты [24]. Можно предположить, что штаммы лактобактерий, выделенные от пациенток с аэробным вагинитом, подвергаются воздействию избыточной концентрации кислорода, который требуется для роста аэробных микроорганизмов и образуется при распаде перекиси водорода.

На наш взгляд среди разнообразных метаболитов, обеспечивающих протективную роль молочнокислых бактерий в вагинальном биотопе, наиболее информативными для клиницистов и доступными для лабораторной практики, следует считать продукцию молочной кислоты, а также способность микроорганизмов приспосабливаться к изменяющимся условиям обитания, в значительной степени обусловленных состоянием макроорганизма. Для подтверждения такой точки зрения необходима иная методология изучения микроэкологии вагинально-цервикального биотопа. Одними из ее составляющих предлагаются апробированные нами тесты лабораторного анализа.

Цель исследования – оценить информативность сочетанного изучения параметров роста и способности продуцировать молочную кислоту клиническими штаммами *Lactobacillus* spp. для характеристики состояния микроэкологии цервикально-вагинального биотопа.

Материал и методы. Штаммы лактобактерий изолировали из отделяемого заднего свода влагалища на лактобакагаре (Оболенск); сопутствующую микрофлору – на кровяном агаре, средах Эндо и Сабуро. Идентификацию микроорганизмов проводили с учетом тинкториальных и культурально-биохимических свойств.

Для изучения кинетики роста в питательную среду МРС, разлитую в лунки плоскодонного полистиролового планшета, вносили тест-штаммы. Культивирование осуществляли в течение 72 ч при 37°C. Каждый час проводили измерение оптической плотности при длине волны 580 нм на планшетном спектрофотометре PowerWave X (Bio-Tek).

Концентрацию молочной кислоты в среде определяли при помощи набора «Молочная кислота – Ольвекс» (Россия), согласно инструкции. Особенность использования набора заключалась в пропорциональном уменьшении объема участников реакции. Пробы отбирали через каждые 12 ч культивирования.

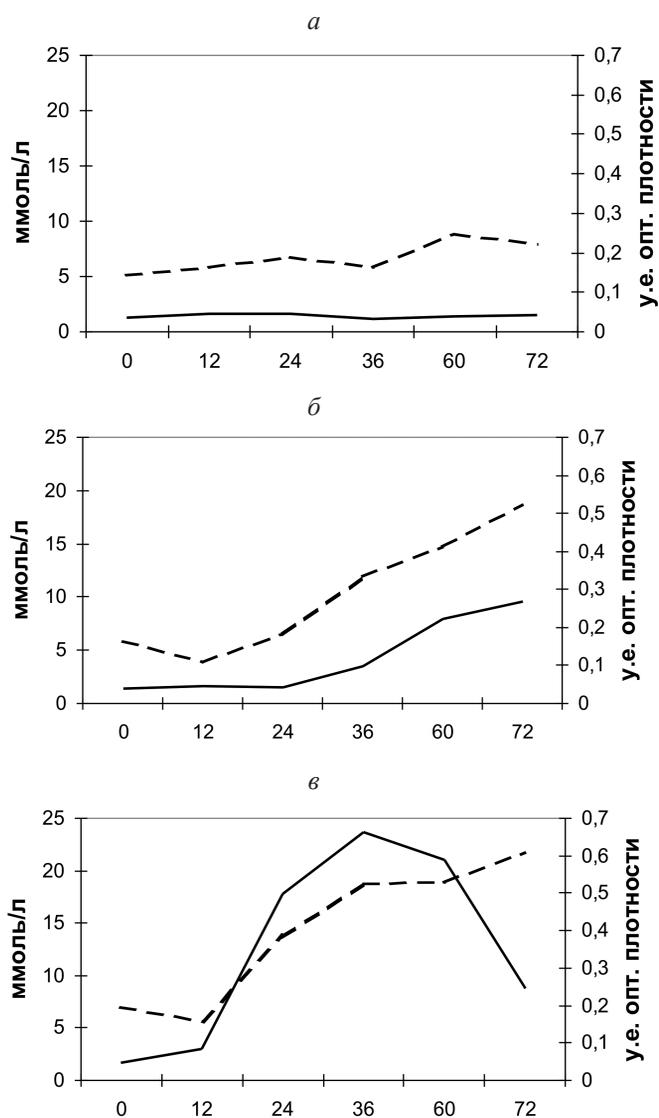
Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики, *t*-критерия Стьюдента.

Результаты. Показано, что 44% штаммов *Lactobacillus* spp. к 72 ч культивирования не достигали фазы экспоненциального роста (рис. 1, а). Известно, что в лаг-фазу бактерии увеличиваются в размерах, но не размножаются. Этот период можно рассматривать как время адаптации микроорганизмов к новым условиям, когда включается индукция ферментов, а также синтез и сборка рибосом. Удлинение лаг-фазы *in vitro* может быть связано с предшествующим пребыванием штаммов в неоптимальных условиях, например,

при увеличении pH [25], что наблюдается у женщин с БВ. Остальные штаммы с 12-24 ч переходили в фазу экспоненциального роста (рис. 1, б, в), т.е. проявляли более высокие адаптивные способности.

В настоящем исследовании по продукции молочной кислоты штаммы, находящиеся в лаг-фазе (рис. 1, а), не отличались друг от друга, поскольку практически не синтезировали этот метаболит. Среди остальных штаммов, находящихся в фазе экспоненциального роста, одни – не продуцировали молочную кислоту, другие с каждым часом наращивали продукцию лактата. Часть штаммов к 36 ч вышла на пик продукции кислоты и к 72 ч наблюдался некоторый спад синтетической активности (рис. 1, в). Эти наблюдения подтверждают мнение О.В. Бухарина и соавт. [26] о том, что на характеристики микроорганизмов может оказывать влияние микроэкологическое окружение, а также ряд факторов макроорганизма. Так, штаммы с короткой лаг-фазой, быстрым накоплением биомассы и максимальной продукцией молочной кислоты выделяли, как правило, из вагинального биотопа, в котором хотя и детектировали *S. aureus*, *E. coli* и БВ-ассоциированные микроорганизмы в избыточном количестве, клинические признаки патологического процесса не наблюдались. Можно предположить, что в такой ситуации вторжение значительного количества «опасных» УПМ служит триггером интенсификации антагонистической активности облигатной флоры, в связи с чем быстро увеличивается численность *Lactobacillus* sp. и продукция молочной кислоты. В другой ситуации, у пациенток с длительным вялотекущим воспалительным процессом, обусловленном продолжительным персистированием в биотопе УПМ или вирусов, лактобактерии теряют свои преимущества, что *in vitro* проявляется в удлинении периода адаптации, медленном накоплении биомассы и отсутствии продукции ключевых метаболитов.

Обсуждение. Сложившуюся к настоящему времени лабораторную практику при исследовании микробиоты генитального тракта женщин, нельзя признать удовлетворительной. Более того, отсутствие унифицированных регламентированных подходов для проведения лабораторных микробиологических исследований затрудняет сравнительную оценку информации, полученной в различных лабораториях и исследовательских учреждениях. В имеющемся отраслевом стандарте 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника», утвержденным приказом Минздрава России № 231 от 09.06.2003 г., предусмотрено лишь определение численности лактобактерий на основе микроскопического метода. При проведении микробиологических исследований содержимого влагалища специалисты вынуждены ориентироваться на разрозненные методические указания и отдельные научные статьи. Повсеместное увлечение методами молекулярно-генетического анализа, с применением модификаций ПЦР, позволяющих лишь констатировать факт наличия/отсутствия тех или иных таксонов, хотя и в значительной степени расширило представление о видовом разнообразии вагинальной микробиоты [27], не позволило ответить



Кинетика накопления биомассы (пунктирная линия) и концентрации молочной.

Кислоты (сплошная линия) штаммами *Lactobacillus* spp. По оси абсцисс – часы; культивирования, по оси ординат – слева концентрация молочной кислоты (ммоль/л); справа – объем биомассы (усл. ед. оптической плотности).

на многие вопросы функционального свойства. При таком подходе нет возможности оценивать метаболические характеристики облигатной микрофлоры, которые важны для обеспечения колонизационной резистентности слизистой оболочки влагалища и, в конечном итоге, дают возможность определить характер складывающихся межмикробных взаимоотношений в конкретных условиях, формирующихся в конкретном организме.

Заключение. В настоящем исследовании показано, что для большинства штаммов *Lactobacillus* spp. характерна вариабельность длительности периода адаптации и уровня функциональной активности. Кроме этого, лишь небольшое число клинических штаммов продуцировали молочную кислоту через

24 ч от начала культивирования. Следовательно, для адекватной оценки микроэкологического статуса вагинального биотопа недостаточно проведения микроскопического изучения как нативного материала, так и культур, изолируемых на специальных питательных средах. Использование молекулярно-генетических тестов в значительной степени облегчает изучение видового разнообразия, однако их результаты не дают исчерпывающей информации для адекватной оценки вклада детектируемых штаммов в складывающиеся «диалоги» облигатных и транзитных видов микроорганизмов, а также в системе «микробиота – макроорганизм». Представляется, что, наряду с использованием современных методов генетического анализа, определение *in vitro* ростовых характеристик, в первую очередь продолжительности лаг-фазы, и продукции лактата штаммами молочнокислых бактерий, как и поиск дополнительных критериев оценки метаболической активности автохтонных и аллохтонных представителей микробиоты генитального тракта, сможет прояснить многие вопросы, связанные с формированием дисбиотических состояний, в частности в вагинальном биотопе, а также послужит повышению эффективности назначаемого при этом лечения.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научных проектов 16-44-590429 p_a и 17-44-590404 p_a.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фоменко Н.В., Хворостова Ю.В., Игнатъева О.А., Акимов И.А., Трухина А.В., Гасилова Н.А. и др. Видовое разнообразие микрофлоры в пробах из урогенитального тракта пациенток крупной сетевой лаборатории и его зависимость от содержания лактобактерий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(3): 59-64.
2. Лисяна Т.А., Пономарева И.Г., Кацалап О.Н., Тимофеева А.Ю. Микроэкология половых путей у женщин с бесплодием хламидийной этиологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(12): 853-7.
3. Anahtar M.N., Gootenberg D.B., Mitchell C.M., Kwon D.S. Cervicovaginal Microbiota and Reproductive Health: The Virtue of Simplicity. *Cell Host Microbe*. 2018; 23(2): 159-68.
4. Döderlein A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das puerperalfieber. Leipzig: E. Besold; 1892.
5. Мавзютов А.Р., Цветкова А.В., Нуретдинова Л.А. Об унификации лабораторных критериев дифференцировки бактериальных вагинозов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(6): 41-5.
6. Cruickshank R., Sharman A. The biology of the vagina in the human subject. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1934; 41(2): 208-26.
7. Nugent R.P., Krohn M.A., Hillier S.L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29(2): 297-301.
8. Spiegel C.A., Amsel R., Holmes K.K. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983; 18(1): 170-7.
9. Бондаренко К.Р., Хасанова Г.Ф., Гайсина Ю.Р., Гараева Л.Н., Мавзютов А.Р. Культуральный метод в диагностике бактериального вагиноза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2007; 9: 70.
10. Цветкова А.В., Муртазина З.А., Маркушева Т.В., Мавзютов А.Р. Сравнительный анализ информативности основных клинических критериев, используемых для диагностики бактериального вагиноза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(5): 41-4.
11. Amabebe E., Anumba D.O.C. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front Med (Lausanne)*. 2018; 5: 181.
12. Мандрыкина Н.Е., Щербо С.И., Тогузов Р.Т. Разработка и применение методов генодиагностики бактериального вагиноза у беременных женщин. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2007; 9: 73.
13. Fettweis J.M., Brooks J.P., Serrano M.G., Sheth N.U., Girerd P.H., Edwards D.J. et al. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiology*. 2014; 160(Pt 10): 2272-82.
14. Madhivanan P., Raphael E., Rumphs A., Krupp K., Ravi K., Srinivas V. et al. Characterization of culturable vaginal Lactobacillus species among women with and without bacterial vaginosis from the United States and India: a cross-sectional study. *J. Med. Microbiol.* 2014; 63(Pt 7): 931-5.
15. Fredricks D.N., Fiedler T.L., Marrazzo J.M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 1899-1911.
16. Srinivasan S., Hoffman N.G., Morgan M.T., Matsen F.A., Fiedler T.L., Hall R.W. et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One*. 2012; 7: e37818.
17. Teixeira G.S., Carvalho F.P., Arantes R.M., Nunes A.C., Moreira J.L., Mendonça M. et al. Characteristics of Lactobacillus and Gardnerella vaginalis from women with or without bacterial vaginosis and their relationships in gnotobiotic mice. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61: 1074-81.
18. Verstraelen H., Verhelst R., Nuytincq L., Roelens K., De Meester E., De Vos D. et al. Gene polymorphisms of Toll-like and related recognition receptors in relation to the vaginal carriage of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae. *J. Reprod. Immunol.* 2009; 79: 163-73.
19. Konings W.N., Kok J., Kuipers O.P., Poolman B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Opin Microbiol.* 2000; 3(3): 276-82.
20. Borges S., Silva J., Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2014; 289(3): 479-89.
21. O'Hanlon D.E., Moench T.R., Cone R.A. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect. Dis.* 2011; 11: 200.
22. Kaewsrirachan J., Peeyananjarassri K., Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2006; 48: 75-83.
23. Wilks M., Wiggins R., Whiley A., Hennessy E., Warwick S., Porter H. et al. Identification and H2O2 Production of Vaginal Lactobacilli from Pregnant Women at High Risk of Preterm Birth and Relation with Outcome. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(2): 713-7.
24. Quatravaux S., Remize F., Bryckaert E., Colavizza D., Guzzo J. Examination of the Lactobacillus plantarum lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *J. Appl. Microbiol.* 2006; 101: 903-12.
25. Juárez Tomás M.S., Wiese B., Nader-Macias M.E. Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal Lactobacillus johnsonii CRL 1294. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 99(6): 1383-91.
26. Бухарин О.В. Инфекционная симбиология – новое понимание старых проблем. *Вестник Российской академии наук*. 2016; 86(10): 915-20.
27. Abdelmaksoud A.A., Koparde V.N., Sheth N.U., Serrano M.G., Glascock A.L., Fettweis J.M. et al. Comparison of Lactobacillus crispatus isolates from Lactobacillus-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. *Microbiology*. 2016; 162(3): 466-75.

REFERENCES:

1. Fomenko N.V., Hvorostova YU.V., Ignat'eva O.A., Akimov I.A., Truhina A.V., Gasilova N.A. et al. Species diversity of microflora in samples from the urogenital tract of patients of a large network laboratory and its dependence on the content of lactobacilli. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(3): 59-64. (in Russian)
2. Lisyana T.A., Ponomareva I.G., Kacalap O.N., Timofeeva A.Yu. Microecology of the genital tract in women with infertility chlamydial etiology. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(12): 853-7. (in Russian)
3. Anahtar M.N., Gootenberg D.B., Mitchell C.M., Kwon D.S. Cervicovaginal Microbiota and Reproductive Health: The Virtue of Simplicity. *Cell Host Microbe*. 2018; 23(2): 159-68.
4. Döderlein A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das puerperalfieber. Leipzig: E. Besold; 1892.
5. Mavzyutov A.R., Cvetkova A.V., Nuretdinova L.A. On the unification of laboratory criteria for the differentiation of bacterial vaginosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(6): 41-5. (in Russian)
6. Cruickshank R., Sharman A. The biology of the vagina in the human subject. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1934; 41(2): 208-26.
7. Nugent R.P., Krohn M.A., Hillier S.L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29(2): 297-301.
8. Spiegel C.A., Amsel R., Holmes K.K. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983; 18(1): 170-7.
9. Bondarenko K.R., Hasanova G.F., Gajgina YU.R., Garaeva L.N., Mavzyutov A.R. Cultural method in the diagnosis of bacterial vaginosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2007; 9: 70. (in Russian)
10. Cvetkova A.V., Murtazina Z.A., Markusheva T.V., Mavzyutov A.R. Comparative analysis of the informativeness of the main clinical criteria used to diagnose bacterial vaginosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(5): 41-4. (in Russian)
11. Amabebe E., Anumba D.O.C. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front Med (Lausanne)*. 2018; 5: 181.
12. Mandrykina N.E., Shcherbo S.I., Toguzov R.T. Development and application of methods of bacterial vaginosis genodiagnosis in pregnant women. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2007; 9: 73. (in Russian)
13. Fettweis J.M., Brooks J.P., Serrano M.G., Sheth N.U., Girerd P.H., Edwards D.J. et al. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiology*. 2014; 160(Pt 10): 2272-82.
14. Madhivanan P., Raphael E., Rumphs A., Krupp K., Ravi K., Srinivas V. et al. Characterization of culturable vaginal Lactobacillus species among women with and without bacterial vaginosis from the United States and India: a cross-sectional study. *J. Med. Microbiol.* 2014; 63(Pt 7): 931-5.
15. Fredricks D.N., Fiedler T.L., Marrazzo J.M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 1899-1911.
16. Srinivasan S., Hoffman N.G., Morgan M.T., Matsen F.A., Fiedler T.L., Hall R.W. et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One*. 2012; 7: e37818.
17. Teixeira G.S., Carvalho F.P., Arantes R.M., Nunes A.C., Moreira J.L., Mendonça M. et al. Characteristics of Lactobacillus and Gardnerella vaginalis from women with or without bacterial vaginosis and their relationships in gnotobiotic mice. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61: 1074-81.
18. Verstraelen H., Verhelst R., Nuytincx L., Roelens K., De Meester E., De Vos D. et al. Gene polymorphisms of Toll-like and related recognition receptors in relation to the vaginal carriage of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae. *J. Reprod. Immunol.* 2009; 79: 163-73.
19. Konings W.N., Kok J., Kuipers O.P., Poolman B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Opin Microbiol.* 2000; 3(3): 276-82.
20. Borges S., Silva J., Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2014; 289(3): 479-89.
21. O'Hanlon D.E., Moench T.R., Cone R.A. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect. Dis.* 2011; 11: 200.
22. Kaewsrichan J., Peeyanjarassri K., Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2006; 48: 75-83.
23. Wilks M., Wiggins R., Whiley A., Hennessy E., Warwick S., Porter H. et al. Identification and H2O2 Production of Vaginal Lactobacilli from Pregnant Women at High Risk of Preterm Birth and Relation with Outcome. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(2): 713-7.
24. Quatravaux S., Remize F., Bryckaert E., Colavizza D., Guzzo J. Examination of the Lactobacillus plantarum lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *J. Appl. Microbiol.* 2006; 101: 903-12.
25. Juárez Tomás M.S., Wiese B., Nader-Macías M.E. Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal Lactobacillus johnsonii CRL 1294. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 99(6): 1383-91.
26. Buharin O.V. Infectious symbiology is a new understanding of old problems. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk*. 2016; 86(10): 915-20. (in Russian)
27. Abdelmaksoud A.A., Koparde V.N., Sheth N.U., Serrano M.G., Glascock A.L., Fettweis J.M. et al. Comparison of Lactobacillus crispatus isolates from Lactobacillus-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. *Microbiology*. 2016; 162(3): 466-75.

Поступила 11.12.18

Принята к печати 21.12.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Оганесян¹ А. Н., Воропаева¹ Е. А., Мельникова² А. А., Миронов¹ А. Ю., Егорова¹ Е. А., Урбан¹ Ю. Н., Гречишникова¹ О. Г., Метельская¹ В. А., Воропаев¹ А. Д.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГНОЙНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО МЕНИНГИТА

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

²Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 127994, Москва, Россия

По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно в мире регистрируется около 1 млн случаев гнойных бактериальных менингитов, из которых 200 тыс. случаев заканчиваются летально. ГБМ - полиэтиологичны, что делает задачу по определению возбудителя - основной при организации эпидемиологического надзора, схемы лечения, планировании профилактических и противоэпидемических мероприятий. Основное влияние на это оказывает качество лабораторной диагностики. При низкой результативности лабораторной диагностики могут быть снижены истинные показатели заболеваемости менингитами различной этиологии. Работа проведена с целью оценки эффективности используемых лабораторных методов при индикации приоритетных возбудителей ГБМ: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*; в рамках выполнения Программы по дозорному эпиднадзору за инвазивными бактериальными заболеваниями (ИБЗ), осуществляемой Европейским региональным бюро ВОЗ в ряде стран Европейского (Украина, Беларусь), Закавказского (Азербайджан, Армения, Грузия), Азиатского (Узбекистан, Кыргызстан, Казахстан) регионов в период 2010-2017 гг. Исследовано 2893 пробы клинического материала (СМЖ, кровь), полученного от пациентов с менингеальным синдромом культуральным методом, РАЛ, ИХ-тест (BinaxNOW), ПЦР (рутинная и в реальном времени), применявшихся для индикации и идентификации *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*. При идентификации возбудителей ГБМ ПЦР результативнее культурального метода в 5 раз при детекции *N. meningitidis*; в 3 раза при детекции *S. pneumoniae*; в 4 раза при детекции *H. influenzae* b. ИХ-тест и РАЛ, позволяют повысить идентификацию возбудителей ГБМ для *N. meningitidis* - на 35,6%; *S. pneumoniae* - на 67%; *H. influenzae* b - на 19,2%, возможна их постановка в полевых условиях и в эпидочаге в случае необходимости. Бактериологическим лабораториям при работе с клиническим материалом от пациентов с диагнозом ГБМ целесообразно дополнять культуральный метод микробиологической диагностики РАЛ, ИХ-тестом или ПЦР.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*; *Neisseria meningitidis*; *Haemophilus influenzae* b; реакция агглютинации латекса; ПЦР; ПЦР-РВ; иммунохроматографический тест; ВОЗ; гнойные бактериальные менингиты.

Для цитирования: Оганесян А. Н., Воропаева Е. А., Мельникова А. А., Миронов А. Ю., Егорова Е. А., Урбан Ю. Н. и др. Эффективность методов лабораторной диагностики гнойного бактериального менингита. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (2): 117-121. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-117-121>

Oganesyan A.N.¹, Voropaeva E.A.¹, Mel'nikova A.A.², Mironov A.Yu.¹, Egorova E.A.¹, Urban Yu.N.¹, Grechishnikova O.G.¹, Metel'skaya V.A.¹, Voropaev A.D.¹

EFFICACY OF LABORATORY METHODS OF DIAGNOSTIC OF PURULENT BACTERIAL MENINGITIS

¹Federal State Institution of Science «Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology», of Federal Service of Surveillance on Consumer' Rights Protection and Human Wellbeing;

²Federal Service of Surveillance on Consumer' Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow

According to the World Health Organization, every year about 1 million cases of purulent bacterial meningitis (PBM) are registered in the world, of which 200 thousand cases end in death. Bacterial meningitis is polyethiologic, which makes the task of determining the pathogen the main in the organization of epidemiological surveillance, treatment regimens, planning of preventive and anti-epidemic measures. The quality of laboratory diagnostics has a key influence on this. The true incidence of meningitis of different etiology can be altered at low-efficiency laboratory diagnostics. This work was carried out to assess the effectiveness of existing laboratory methods for the detection of PBM pathogens: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis*; as a part of the programme on sentinel surveillance of invasive bacterial diseases (IBD) carried out by the WHO regional office for Europe in a number of countries in Europe (Ukraine, Belarus), Transcaucasia (Azerbaijan, Armenia, Georgia), Asia (Uzbekistan, Kyrgyzstan, Kazakhstan) in the period 2010-2017. 2893 samples of clinical material (CSF and blood) obtained from patients with the meningeal syndrome were studied by four diagnostic methods: cultural method, latex-agglutination test, immunochromatographic test (BinaxNOW), PCR (conventional and real-time), used to identify the following pathogens: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*. When identifying the causative agents of BM, PCR more effective than culture method is 5 times in detecting *N. meningitidis*; 3 times in the detection of *S. pneumoniae*; 4 times the detection of *H. influenzae* b. Latex-agglutination test and immunochromatographic test allow to increase the identification of pathogens of BM for *N. meningitidis* - by 35.6%; *S. pneumoniae* - by 67%; *H. influenzae* b - by 19.2%, it is possible to set them in the field and at the epidpoint if necessary. When working with clinical material from patients diagnosed with GBM, it is advisable for bacteriological laboratories to complement the culture method of microbiological diagnosis of latex-agglutination test, immunochromatographic test or PCR.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; *Neisseria meningitidis*; *Haemophilus influenzae* b; latex agglutination reaction; PCR; real-time PCR; immunochromatographic test; WHO; purulent bacterial meningitis.

For citation: A. N. Oganessian, E. A. Voropaeva, A. A. Mel'nikova, A. Yu. Mironov, E. A. Egorova, Yu. N. Urban, et al. Efficacy of laboratory methods of diagnostic of purulent bacterial meningitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (2): 117-121 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2019-64-2-117-121>

For correspondence: Oganessian A.N., PHD student; e-mail: oganesyan.ayk@gmail.com

Information about authors:

A. N. Oganessian, <https://orcid.org/0000-0002-0826-919X>
E. A. Voropaeva, <https://orcid.org/0000-0002-0463-0136>
A. A. Mel'nikova, <https://orcid.org/0000-0002-5651-1331>
A. Yu. Mironov, <http://orcid.org/0000-0002-8544-5230>
E. A. Egorova, <https://orcid.org/0000-0003-1096-4324>
Yu. N. Urban, <https://orcid.org/0000-0003-3826-6026>
O. G. Grechishnikova, <https://orcid.org/0000-0002-0999-836X>
V. A. Metel'skaya, <https://orcid.org/0000-0002-4806-3823>
A. D. Voropaev <https://orcid.org/0000-0002-6431-811X>

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

Acknowledgment. The study was conducted as part of a sentinel program for invasive bacterial diseases, funded by WHO.

Received 23.10.2018
Accepted 01.11.2018

Введение. Гнойные бактериальные менингиты (ГБМ) – тяжёлые инфекционные заболевания, приоритетными патогенами которых являются *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, характеризующиеся воспалением оболочек мозга, ведущие к значительной заболеваемости и смертности во всем мире [14].

Благодаря проводимой иммунопрофилактике заболеваемость менингитом в мире снижается, хотя сохраняется высокая смертность, многие больные теряют трудоспособность из-за несвоевременной диагностики болезни. В России более половины случаев ГБМ остаются этиологически нерасшифрованными. *H. influenzae* и *S. pneumoniae* могут вызывать бронхит, средний отит, синусит, пневмонию, артрит, эндокардит, остеомиелит, перикардит, целлюлит у иммунокомпрометированных лиц. *N. meningitidis* вызывает генерализованные формы менингококковой инфекции, в том числе менингит. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) ежегодно в мире регистрируется около 1 млн случаев ГБМ, из которых 200 тыс. случаев заканчиваются летально. За период 2010-2017 гг. в РФ показатель заболеваемости ГБМ снизился с 2,2 (2010 г.) до 1,5 (2017 г.) на 100 тыс. населения, генерализованными формами менингококковой инфекции (ГФМИ) – снизился с 1,0 (2010 г.) до 0,49 (2017 г.) 100 тыс. населения, ГБМ неменингококковой и неясной этиологии (ГБМНМИНЭ) – снизился с 1,2 (2010 г.) до 1,03 (2017 г.) на 100 тыс. населения [1, 5, 6].

ГБМ – полиэтиологичное заболевание, вызываемое различными видами патогенных и условно-патогенных бактерий. Это делает индикацию этиологического агента ГБМ основной процедурой при организации эпидемиологического надзора, схемы лечения, планировании профилактических и противоэпидемических мероприятий. Качество и результативность лабораторной диагностики влияют на достоверность расшифровки этиологической структуры ГБМ. Низкая результативность лабораторной диагностики ГБМ может занижать истинные показатели заболеваемости менингитами различной

этиологии. В 2017 году в РФ из 2217 случаев ГБМ и ГФМИ удалось этиологически расшифровать 1163 случаев (52,5%). В этиологической структуре расшифрованных случаев преобладали *N. meningitidis* (41%), далее по частоте выделения следовал *S. pneumoniae* (32%) и *H. influenzae* (11%). На долю прочих возбудителей ГБМ приходилось 17% [1, 5, 6].

Ведущая роль в постановке этиологического диагноза заболеваний, вызываемых *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* принадлежит микробиологической диагностике, которая направлена на выделение и идентификацию возбудителя, определение его чувствительности к антимикробным препаратам. Микробиологическая диагностика проводится культуральным и экспресс-методами. Культуральный метод является ведущим методом микробиологической диагностики ГБМ. Поскольку, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* имеют сложные питательные потребности и требуют для своего выделения применения обогащенных питательных сред, таких как сывороточный, кровяной, шоколадный агар, и сложных условий культивирования (создание капнофильных условий в CO₂-инкубаторе или в эксикаторе с зажжённой свечой), процент их положительных обнаружений в исследуемом материале может быть невелик [4].

Работа проведена в рамках выполнения Программы по дозорному эпиднадзору за инвазивными бактериальными заболеваниями (ИБЗ), вызываемыми *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, осуществляемой Европейским региональным бюро ВОЗ в ряде стран Европейского (Украина, Беларусь), Закавказского (Азербайджан, Армения, Грузия), Азиатского (Узбекистан, Кыргызстан, Казахстан) регионов в период 2010-2017 гг. Эпидемиология ГБМ в указанных странах до сих пор продолжает оставаться недостаточно изученной.

Цель работы - оценка эффективности используемых лабораторных методов диагностики при выявлении приоритетных возбудителей ГБМ: *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*.

Материал и методы. Исследованы 2893 образца клинического материала (СМЖ, кровь), полученного

от пациентов с менингеальным синдромом. Для микробиологической диагностики с целью выявления *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* использован культуральный метод, латекс-агглютинация (РАЛ), иммунохроматография (ИХ) (BinaxNOW), ПЦР (рутинная и в реальном времени) [7, 13].

Культуральным методом исследовали все пробы спинномозговой жидкости (СМЖ) и крови при развитии септицемии. Исследуемый материал заседали на обогащённые питательные среды: колумбийский агар с добавлением 5% дефибринированной крови барана или лошади, «шоколадный агар» на основе сухого гемоглобина, с добавлением ростовой добавки, содержащей никотинадениндинуклеотид (НАД, V фактор) и гемин (X фактор) (Oxoid, Великобритания). Посевы инкубировали в термостате при 37° С в течение 24-48 ч в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для создания капнофильных условий использовали анаэробостаты (Oxoid, Великобритания) и газогенераторную систему (Oxoid, Великобритания). Выделение чистой культуры возбудителя и её идентификацию проводили общепринятыми методами [2, 3].

Для постановки реакции агглютинации латекса (РАЛ) использован набор Pastorex Meningitis (Bio-Rad, США). Принцип РАЛ заключается в следующем: антиген, содержащийся в тестируемом образце, идентифицируется с использованием частиц латекса, покрытых специфичными гомологичными антителами. В присутствии гомологичного антигена частицы латекса агглютинируют, а при его отсутствии, они остаются в виде гомогенной суспензии. Данный набор специфичен для *N. meningitidis* серогрупп А, С, Y/W; *N. meningitidis* серогруппы В; *E. coli* K₁; *H. influenzae* тип b; *S. pneumoniae*; *S. agalactiae*. Чувствительность и специфичность данного набора для *N. meningitidis* серогруппы А составляет 87 и 93%, соответственно, для *N. meningitidis* серогруппы W - 85 и 97%, соответственно, для *N. meningitidis* серогруппы С - 80 и 94,4%, соответственно. В странах менингитного пояса Африки РАЛ является единственной возможностью быстрой диагностики возбудителя менингита [9].

Иммунохроматографический тест (ИХ) BinaxNOW является экспресс-тестом для качественной детекции антигена *S. pneumoniae* в образцах СМЖ, полученных от пациентов с симптомами менингита. ИХ-тест в сочетании с культуральным методом предназначен для экспресс-диагностики пневмококкового менингита. ИХ-тест проводится на мембране, для выявления растворимого антигена пневмококка в СМЖ. Кроличьи антитела к антигену *S. pneumoniae* адсорбированы в виде полосы на нитроцеллюлозной мембране в зоне чтения результата пациента. Козья антиглобулиновая сыворотка против IgG кролика адсорбирована на той же мембране в виде второй полосы (контрольная линия). Кроличьи антитела к антигену *S. pneumoniae* вместе с антивидовыми антителами, конъюгированные с окрашенными частицами для визуализации, нанесены на волокнистую инертную подложку и высушены. Подложка, содержащая конъюгат и мембранная полоска соединены для формирования тест-полоски. Данная тест-полоска вмонтирована в кассету в форме открывающейся книжки, имеющую лунку

для внесения тампона с исследуемым в ИХ-тесте образцом, расположенную на противоположной стороне кассеты. Результаты ИХ-теста интерпретируются по наличию или отсутствию визуально различимых окрашенных линий от розового до пурпурного цвета. Положительный результат, регистрируемый спустя 15 мин, в зависимости от концентрации антигена, присутствующего в тестируемом образце, включает выявление двух окрашенных линий в зоне чтения результата тестирования пациента. Отрицательный результат, читаемый также через 15 минут, даёт только одну окрашенную контрольную линию, свидетельствуя о том, что антиген *S. pneumoniae* в тестируемом образце не обнаружен. Отсутствие окрашенной контрольной линии, вне зависимости от наличия или отсутствия окрашенной линии в зоне чтения результата пациента, свидетельствует о недействительности проведённого теста. Чувствительность и специфичность BinaxNOW составляют от 95,4 до 100% и от 98,6 до 100%, соответственно [10–12].

Молекулярно-генетические методы исследования. Экстракцию ДНК из СМЖ осуществляли с помощью коммерческого набора для выделения ДНК QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, США), согласно протоколу производителя. Для экстракции хромосомальной ДНК из культур бактерий использован метод кипячения.

Видовую детекцию *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, определение серогруппы *N. meningitidis* и серовара *H. influenzae*, осуществляли с помощью ПЦР-РВ. Использованы последовательности праймеров и флуоресцентно меченные зонды, рекомендованные руководством ВОЗ [13].

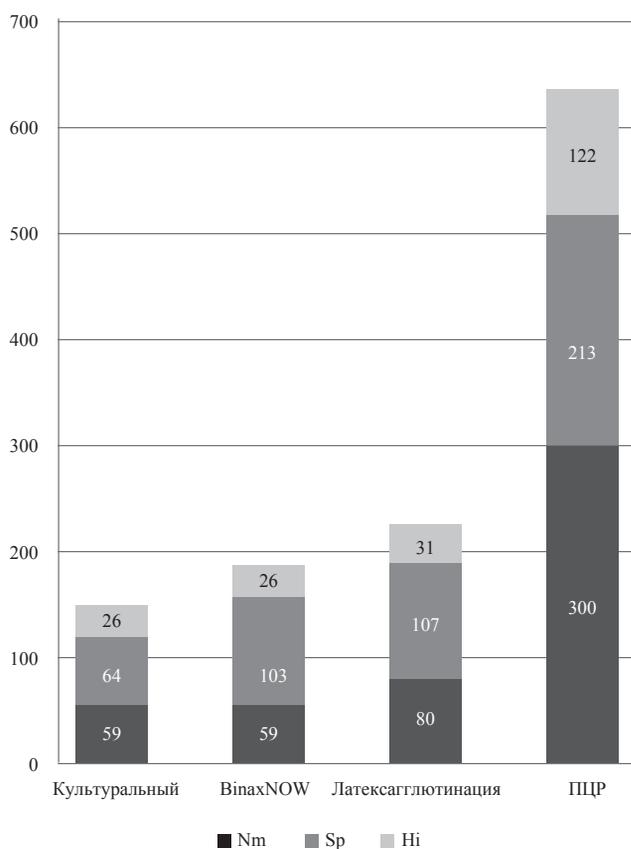
Для определения серогруппы или серовара *S. pneumoniae* применён метод мультиплексной ПЦР-РВ и мультиплексная ПЦР (мПЦР) с детекцией в агарозном геле. Амплификацию с детекцией в режиме реального времени проводили в амплификаторе ABI 7500 (Applied Biosystems, США). Продукты амплификации визуализировали на трансиллюминаторе ECX-20L (Vilber Lourmat, Германия). Последовательности праймеров и протоколы реакций доступны на веб-сайте CDC, США (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/pcr>).

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

Статистическая обработка данных проведена с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. При исследовании 2893 образцов клинического материала получены следующие результаты. С использованием культурального метода чистая культура возбудителя выделена и идентифицирована в 149 пробах (5,2%). Среди клинических изолятов идентифицированы: *N. meningitidis* – 59 проб; *S. pneumoniae* – 64 пробы; *H. influenzae* b – 26 проб.

Применение набора BinaxNOW позволило повысить количество этиологически расшифрованных проб до 188 (6,5%) за счёт увеличения количества выявленных *S. pneumoniae* на 60%. Количество положительных образцов исследуемого материала от



Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики ГБМ

пациентов, содержащих *S. pneumoniae* составило 103 (3,6%).

При использовании дополнительно РАЛ количество положительных в отношении искомым возбудителей проб возросло до 218 (7,5%). В положительных пробах клинического материала определены: *N. meningitidis* – 80 проб (2,8%); *S. pneumoniae* – 107 проб (3,7%); *H. influenzae b* – 31 проба (1,1%).

Применение ПЦР повысило детекцию возбудителей ГБМ в пробах до 635 (22%). В положительных пробах клинического материала определены: *N. meningitidis* – 300 проб (10,4%); *S. pneumoniae* – 213 проб (7,4%); *H. influenzae b* – 122 проб (4,2%).

Сравнительный анализ эффективности методов лабораторной диагностики ГБМ представлены на рисунке.

Основной задачей при организации эпидемиологического надзора, схемы лечения, планировании профилактических и противоэпидемических мероприятий при ГБМ является идентификация возбудителя, в связи с полиэтиологичностью данного заболевания.

Культуральный метод исследования является «золотым стандартом», который позволяет выделить и идентифицировать чистую культуру возбудителя, определить его чувствительность к антибиотикам, провести внутривидовую идентификацию с целью эпидемического маркирования, депонировать инте-

ресные клинические изоляты в национальные и др. коллекции штаммов. Однако, культуральный метод дорогостоящ и длителен. Он требует наличия хорошо оснащённой бактериологической лаборатории, располагающей широким набором дорогих элективных, дифференциально-диагностических и др. питательных сред, тест-систем для идентификации, реагентов, лабораторного оборудования (анаэробостаты, CO₂-инкубаторы и др.), высоко квалифицированного врачебного и лаборантского персонала. Выполнение бактериологических исследований в полевых условиях вызывает определённые затруднения.

Бактериологическим методом чистая культура возбудителя нами выделена и идентифицирована лишь в 149 пробах (5,2%), что объясняется низкой устойчивостью исследуемых данных возбудителей в окружающей среде, их требовательностью к условиям культивирования и питательным средам, частым началом эмпирической антибиотикотерапии до взятия материала от пациента на исследование.

Настоящее исследование показало, что использование ИХ-теста и РАЛ позволяет повысить идентификацию приоритетных патогенов ГБМ для *N. meningitidis* – на 35,6%; *S. pneumoniae* – на 67%; *H. influenzae b* – на 19,2%. Важно отметить, что проведение ИХ-теста и РАЛ возможно в полевых условиях, поскольку не требует специального лабораторного оборудования, за исключением готовых наборов, специальных навыков у исследователя (имеются доступные инструкции). Кроме того, ИХ-теста и РАЛ выявляют даже нежизнеспособные и разрушенные формы микроорганизмов, что актуально в условиях раннего начала антибиотикотерапии.

Наиболее эффективным методом идентификации в данном исследовании является ПЦР. Необходимо учитывать, что ПЦР, требует наличия специального оборудования и реактивов, специальных навыков и умений у исследователя, длительной пробоподготовки (за исключением direct ПЦР). ПЦР позволяет определить довольно малые и нежизнеспособные концентрации возбудителя в биологических средах пациента и имеет высокую чувствительность и специфичность.

Выводы. При идентификации возбудителей ГБМ ПЦР результативнее культурального метода в 5 раз при детекции *N. meningitidis*; в 3 раза при детекции *S. pneumoniae*; в 4 раза при детекции *H. influenzae b*.

ИХ-тест и РАЛ, позволяют повысить идентификацию возбудителей ГБМ для *N. meningitidis* – на 35,6%; *S. pneumoniae* – на 67%; *H. influenzae b* – на 19,2%, возможна их постановка в полевых условиях и в эпидочаге в случае необходимости.

Бактериологическим лабораториям при работе с клиническим материалом от пациентов с диагнозом ГБМ целесообразно дополнять культуральный метод микробиологической диагностики РАЛ, ИХ-тестом или ПЦР.

Для повышения выявления патогенов ГБМ в исследуемом клиническом материале оптимально сочетание культурального метода с ПЦР, РАЛ, ИХ.

Финансирование. Исследование проведено в рамках программы по дозорному эпиднадзору за инвазив-

ными бактериальными заболеваниями, при финансировании ВОЗ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 8-14 см. REFERENCES)

1. Информационно-аналитический обзор «Менингококковая инфекция и гнойные бактериальные менингиты в Российской Федерации»; 2018.
2. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещенко А.С., ред. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований. 2-е издание. СПб: Лань; 2017.
3. Меньшиков В.В., ред. Методики клинических лабораторных исследований: справочное пособие в 3-х томах. Том. 3. М.: ООО «Лабора»; 2009.
4. Миронов А.Ю., Воробьев А.А. Патогенные кокки. М.: Издательский дом «Русский врач»; 2000.
5. Миронов А.Ю., Савицкая К.И., Воробьев А.А. Условно-патогенные микроорганизмы при гнойно-воспалительных заболеваниях ЛОР-органов и менингитах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2001; 2: 21-5.
6. Миронов А.Ю., Савицкая К.И., Воробьев А.А., Нестерова М.В. Микрофлора при заболеваниях ЛОР-органов и нервной системы у больных региона Московской области. *Вестник оториноларингологии*. 2001; 4: 31-5.
7. МУК 4.2.1887-04 «Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов: Методические указания». Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2005.
8. Data from the website of the European Committee for Testing for Sensitivity to Antibiotics. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf
9. <http://www.who.int/iris/handle/10665/70765>
10. Kennedy U., Bestmana A., Kamaub C., Dominique A. Caugant, Greigd J. Evaluation of Pastorex meningitis kit performance for the rapid identification of *Neisseria meningitidis* serogroup C in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2016; 110:381-5.
11. Luis Molinos, Rafael Zalacain, Rosario Menendez, Soledad Reyes, Alberto Capelastegui, Catia Cilloniz et al. Sensitivity, Specificity, and Positivity Predictors of the Pneumococcal Urinary Antigen Test in Community-Acquired Pneumonia. *Annals ATS*. 2015; 12 (10):1482-9.
12. Nobuyuki Horita, Naoki Miyazawa, Ryota Kojima, Naoko Kimura, Miyo Inoue, Yoshiaki Ishigatsubo et al. Sensitivity and specificity of the Streptococcus pneumoniae urinary antigen test for unconcentrated urine from adult patients with pneumonia: A meta-analysis. *Respirology*. 2013; 18: 1177-83.
13. Samra Z., Shmueli H., Nahum E., Paghis D., Ben-Ari J. Use of the NOW Streptococcus pneumoniae urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45(4):237-40.
14. WHO MANUAL, 2nd ed. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO/IVB.11.09.-2011. Available at: <http://www.who.int/iris/handle/10665/70765>
15. World Health Organization (WHO). Meningococcal meningitis: Fact sheet 2017 [updated December 2017; cited 2017 November 9]. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/en/>

REFERENCES

1. Informational and analytical review «Meningococcal infection and purulent bacterial meningitis in the Russian Federation»; 2018. (in Russian)
2. Labinskaya A.S., Blinkova L.P., Eschena A.S., eds. Private medical microbiology with the technique of microbiological research. 2nd ed., rev. St.Petersburg: Lan'; 2017. (in Russian)
3. Men'shikov V.V., ed. Methods of clinical laboratory studies: a reference guide in 3 volumes. Tom. 3. Moscow: Labora; 2009. (in Russian)
4. Mironov A.Yu., Vorob'yev A.A. Pathogenic cocci [Patogennyye kokki]. Moscow: Russkiy vrach; 2000. (in Russian)
5. Mironov A.Yu., Savitskaya K.I., Vorob'yov A.A. Conditionally pathogenic microorganisms in inflammatory diseases of the upper respiratory tract and meningitis *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2001; 2: 21-5. (in Russian)
6. Mironov A.Yu., Savitskaya K. I., Vorob'yov A.A., Nesterova M.V. Microflora in diseases of the upper respiratory tract and the nervous system in patients with the Moscow Region region. *Vestnik otorinolaringologii*. 2001; 4: 31-5. (in Russian)
7. МУК 4.2.1887-04 «Laboratory diagnosis of meningococcal infection and purulent bacterial meningitis: Guidelines» Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор; 2005. (in Russian)
8. Data from the website of the European Committee for Testing for Sensitivity to Antibiotics. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf
9. <http://www.who.int/iris/handle/10665/70765>
10. Kennedy U., Bestmana A., Kamaub C., Dominique A. Caugant, Greigd J. Evaluation of Pastorex meningitis kit performance for the rapid identification of *Neisseria meningitidis* serogroup C in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2016; 110:381-5.
11. Luis Molinos, Rafael Zalacain, Rosario Menendez, Soledad Reyes, Alberto Capelastegui, Catia Cilloniz et al. Sensitivity, Specificity, and Positivity Predictors of the Pneumococcal Urinary Antigen Test in Community-Acquired Pneumonia. *Annals ATS*. 2015; 12 (10):1482-9.
12. Nobuyuki Horita, Naoki Miyazawa, Ryota Kojima, Naoko Kimura, Miyo Inoue, Yoshiaki Ishigatsubo et al. Sensitivity and specificity of the Streptococcus pneumoniae urinary antigen test for unconcentrated urine from adult patients with pneumonia: A meta-analysis. *Respirology*. 2013; 18: 1177-83.
13. Samra Z., Shmueli H., Nahum E., Paghis D., Ben-Ari J. Use of the NOW Streptococcus pneumoniae urinary antigen test in cerebrospinal fluid for rapid diagnosis of pneumococcal meningitis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45(4):237-40.
14. WHO MANUAL, 2nd ed. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. WHO/IVB.11.09.-2011. Available at: <http://www.who.int/iris/handle/10665/70765>
15. World Health Organization (WHO). Meningococcal meningitis: Fact sheet 2017 [updated December 2017; cited 2017 November 9]. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/en/>

Поступила 23.10.18

Принята к печати 01.11.18

Кецко Ю. Л.¹, Лунина А. В.¹, Гусякова О. А.¹, Петровская Е. В.¹, Лямин А. В.¹, Козлов А. В.¹, Новокщёнов С. Г.²

ПОКАЗАТЕЛИ ОСНОВНОГО ОБМЕНА ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ СИНДРОМЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ГЕНЕЗА: ПРЕДИКТОРЫ ПРОГНОЗА ИЛИ НЕОБХОДИМОСТЬ СВОЕВРЕМЕННОЙ КОРРЕКЦИИ?

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия;

²ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет» Минобрнауки РФ, 443100, Самара, Россия

Цель исследования - определение сравнительной значимости показателей основного обмена и маркёров воспалительного процесса на ближайший прогноз заболевания пациентов ОРИТ с синдром системного воспаления инфекционного генеза. Представлены результаты ретроспективного анализа лечения 198 пациентов с подтверждёнными клинико-лабораторными признаками бактериальной инфекции. У пациентов определяли количество лейкоцитов, тромбоцитов, процентного содержания лимфоцитов, концентрацию прокальцитонина, креатинина, билирубина, С-реактивного белка, показатели КЩС. Оценку степени тяжести пациентов проводили по шкале SOFA. Вид биоматериала для микробиологических исследований определялся в зависимости от предполагаемого источника инфекционного воспаления. Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили методом времяпролетной MALDI ToF масс-спектрометрии с последующим определением антибиотикорезистентности. Эмпирическая антибактериальная терапия назначалась при поступлении пациента в ОРИТ. Инверсия на этиотропную антибактериальную терапию проводилась через 48 час. с учётом результатов микробиологического исследования. Определение основного обмена осуществляли методом непрямой калориметрии (CCM Express, Medical Graphics) с расчётом: основного обмена, дыхательного коэффициента, абсолютного и относительного количества макронутриентов. Расчёт белка производился, исходя из уровня азота суточной мочевины мочи. Логистический анализ (ROC-анализ) позволил выявить, что при используемой стратегии антибактериальной терапии возраст, пол пациентов, тинкториальные свойства выделенных от пациентов, микроорганизмов не влияют на ближайший прогноз заболевания. Степень тяжести состояния пациента по шкале SOFA, концентрация прокальцитонина в крови, и такие параметры метаболического статуса, как потребность в килокалориях на килограмм фактической массы тела и процент белковых калорий достоверно влияют на ближайший прогноз заболевания. При этом процент калорий, получаемых за счёт метаболизма белка, в основном обмене имеет высокую достоверную прогностическую ценность. Результаты исследования подтверждают важность адекватной нутриционной терапии в лечении пациентов с инфекционным воспалительным синдромом, включающего расчёт и коррекцию белковых потерь и суммарного суточного калоража.

Ключевые слова: основной обмен; воспаление; непрямая калориметрия; микробиологическое исследование; антибактериальная терапия.

Для цитирования: Кецко Ю. Л., Лунина А. В., Гусякова О. А., Петровская Е. В., Лямин А. В., Козлов А. В., Новокщёнов С. Г. Показатели основного обмена при воспалительном синдроме бактериального генеза: предикторы прогноза или необходимость своевременной коррекции? Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64 (2): 122-127.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-122-127>

Ketsko Yu. L.¹, Lunina A. V.¹, Gusyaykova O. A.¹, Petrovskaya E. V.¹, Lyamin A. V.¹, Kozlov A. V., Novokshchenov S. G.²

THE INDICATORS OF BASAL METABOLISM IN INFLAMMATORY SYNDROME BACTERIAL ORIGIN: PREDICTORS OF PROGNOSIS OR THE NEED FOR TIMELY CORRECTION?

¹Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia;

²Samara State Technical University 443100, Samara, Russia

The aim of the study was to determine the comparative significance of basal metabolism indicators and inflammatory process markers for the closest prognosis of patients in ICUs with systemic inflammation syndrome caused with infectious genesis. The paper presents the results of a retrospective analysis of the plan of treatment of 198 patients with confirmed clinical and laboratory signs of bacterial infection. The number of leukocytes, platelets, the percentage of lymphocytes, the concentration of procalcitonin, creatinine, bilirubin, C-reactive protein, acid-base balance values were determined in patients. Patients were assessed on a SOFA scale. The type of biomaterial for microbiological research was determined depending on the intended source of infectious inflammation. Identification of the isolated microorganisms was carried out using the MALDI ToF mass spectrometry method, followed by determination of antibiotic resistance. Empirical antibiotic therapy was prescribed upon admission of the patient to the ICU. Patients were switched to etiotropic antibacterial therapy after 48 hours, taking into account the results of a microbiological study. Determination of basal metabolic rate was carried out using the method of indirect calorimetry (CCM Express, Medical Graphics) with the calculation of basal metabolism, respiratory coefficient, absolute and relative amount of macronutrients. The calculation of the protein was made on the basis of the nitrogen level of the daily urine urea. Logistic analysis (ROC analysis) revealed that the antibacterial therapy strategy used, age, gender of patients, tinctorial properties of microorganisms isolated from patients, do not affect the nearest prognosis of the disease. On the contrary, SOFA score, the concentration of procalcitonin in the blood, and such parameters of the metabolic status as the need for kilocalories per kilogram of actual body weight and the percentage of protein calories significantly affect the nearest prognosis of the disease. The percentage of calories derived from protein metabolism, in the main exchange has a high reliable predictive value. The results of the study confirm the importance of adequate nutritional therapy in the treatment of patients with infectious inflammatory syndrome, including the calculation and correction of protein loss and total daily calorie.

Key words: *basic metabolism; inflammation; indirect calorimetry; microbiological research; antibacterial therapy.*

For citation: Ketsko Yu.L., Lunina A.V., Gusyakova O.A., Petrovskaya E.V., Lyamin A.V., Kozlov A.V., Novokshchenov S.G. *The indicators of basal metabolism in inflammatory syndrome bacterial origin: predictors of prognosis or the need for timely correction? Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (2): 122-127 (in Russ.) DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-2-122-127>*

For correspondence: Kozlov Andrey Vladimirovich, assistant of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics ; e-mail: kozlov.biochemistry@yandex.ru

Information about authors:

Ketsko J.L., <https://orcid.org/0000-0002-2749-8692>

Lunina A.V., <https://orcid.org/0000-0002-4405-4604>

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

Petrovskaya E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7951-8034>

Lyamin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5905-1895>

Kozlov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-9384-6854>

Novokshchenov S.G., <https://orcid.org/0000-0003-0913-4403>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 17.01.2019
Accepted 21.01.2019

Введение. Сложность лечения бактериальных инфекций в ОРИТ определяется многими факторами: тяжесть состояния пациента, имеющийся инфекционный очаг при поступлении, риск контакта пациента с полирезистентной бактериальной микрофлорой, высокий процент инвазивных манипуляций и т.д. [1]. По данным литературы инфекцию различной локализации на момент пребывания в ОРИТ имеет 51% больных (от 56,4 и 60,1%), уровень летальности этих пациентов в 2,4 раза превышает летальность среди пациентов ОРИТ без инфекции (30,4% vs 12,7%, [2,3]).

Инфекционный воспалительный синдром имеет чёткую клиническую картину и лабораторные маркёры. В электронной базе данных PubMed более 178 различных лабораторных биомаркёров сепсиса, из них только 5 имеют достоверные данные по чувствительности и специфичности более чем 90% [4]. Из них прокальцитониновый тест продолжает иметь высокую диагностическую ценность, особенно при бактериемиях [5,6]. В качестве дополнительных критериев выступают: выраженность лейкоцитоза, лимфопении, их соотношение, степень тромбоцитопении, значение лактата крови [7,8].

Уровень провоспалительных цитокинов (IL-6, 8, 12, TNF), клеточных биомаркёров (CD₁₄, CD₂₅, CD₂₈, mHLA-DR), рецепторов иммунокомпетентных клеток (CRTh₂, Fas receptor, FLT-1, TLR 2,4, TREM-1, uPAR), показатели гемостаза, влияющие на исход системного инфекционного процесса (АТ III, АРТТ, D-dimer, PT, TFPI, PAI-I, prot. C et S) пока не имеют прикладного значения [9].

Не смотря на тесную взаимосвязь нутриционного статуса пациента с клиническим исходом инфекционного процесса (продолжительность госпитализации, осложнения, летальность) [10], показатели основного обмена в качестве маркёров инфекционного процесса не используются, что, видимо, связано с ограниченным использованием метода непрямой калориметрии. Требуемые для данной группы пациентов уровни общего калоража, белковых калорий находятся

на уровне дискуссий [11]. Трудность рандомизации пациентов с учётом первичного нутриционного статуса, стадийность воспалительного процесса, необходимость тщательного контроля основного обмена не позволяет сделать однозначные выводы. Аксиомой для данной группы пациентов с точки зрения нутриционной поддержки является – обеспечение требуемым количеством калорий и белка в соответствие с потребностями [12].

Особенностями метаболического ответа у пациентов ОРИТ является усиление катаболизма белка и быстрое истощение пластических и энергетических ресурсов организма (инсулинорезистентность, гиперлактатемия), ранняя потеря мышечной массы (в течение первой недели заболевания). Происходит мобилизация белков в первую очередь из печени, крови, органов ЖКТ, скелетных мышц.

Цель - определить сравнительную значимость показателей основного обмена и маркёров воспалительного процесса на ближайший прогноз заболевания пациентов ОРИТ с синдром системного воспаления инфекционного генеза.

Материал и методы. Проводился ретроспективный анализ лечения 198 пациентов с подтверждёнными клинико-лабораторными признаками бактериальной инфекции.

Рандомизацию пациентов производили по намеченным срокам исследования (март 2017 г. – апрель 2018 г.), возрасту пациентов (от 16 лет до 90 лет), наличию признаков синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) и положительных результатов бактериологического исследования.

Клинико-лабораторные признаки ССВО являлись основой забора биоматериала. Исследованы: уровень лейкоцитов, тромбоцитов, процент лимфоцитов (Sysmex KX-21, Roche), Pct (ECL, «Elecsys 2010»), креатинин, билирубин (Integra 400+, «Roche»), показатели КЩС (i-STAT, Abbott). Степень тяжести пациентов рассчитывалась по шкале SOFA. Биологический материал для микробиологического исследования собира-

Характеристика больных по локализации очага инфекции

Локализация источника инфекции	Количество больных	%
Лёгкие	76	38,4
Брюшная полость	70	35,4
Кожа, мягкие ткани	20	10,1
Центральная нервная система	16	8,1
Мочеполовая система	12	6
Кровь (бактериемия)	4	2

ли на момент поступления. Сбор и транспортировку материала в бактериологическую лабораторию осуществляли в соответствии с МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории». В лаборатории материал засеивали на плотные питательные среды: кровяной агар, хромогенные среды, агар Сабуру. После инкубации в течение 18-24 час выросшие микроорганизмы идентифицировали с использованием времяпролетной MALDI ToF масс-спектрометрии (Microflex LT, Bruker®). У выделенных микроорганизмов определяли чувствительность к антимикробным препаратам в соответствии с Клиническими рекомендациями «Опре-

деление чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» 2015-02. В среднем через 48 час в лечебном процессе использованы результаты определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Основной обмен у пациентов определялся методом непрямой калориметрии (СМ Express, Medical Graphics) с помощью лицевой маски, либо через дыхательный контур с расчётом: основного обмена (REE, ккал/сутки), дыхательного коэффициента (RQ), абсолютного и относительного количества макронутриентов (Prot, Fat, CHO). Расчёт белка производился, исходя из уровня азота суточной мочевины мочи.

Дизайн исследования и статистическая обработка. Возраст, пол, лабораторные данные, показатели непрямой калориметрии представлены в виде таблиц описательной статистики. Репрезентативность выборки (nd- normal distribution) оценена по критерию Колмогорова-Смирнова (K-S). Анализ зависимости осуществлён методом логистической регрессии с учётом непрерывных, дискретных, бинарных (дихотомических), переменных. Характер возбудителя шифровался арабскими цифрами. Доверительный интервал (confidence interval, CI) установлен на уровне 95% и определялся как $\pm 1,96$ стандартной ошибки. Достоверность различий определена стандартно ($p < 0,005$). Диагностическая значимость шкалы AUC, отражала качество взаимосвязи между зависимыми переменными и классификационной переменной – исход в условиях ОРИТ. Статистический анализ проведён с помощью пакета программ SPSS 13 (IBM, SPSS, AMOS).

Результаты. Общее количество исследуемых пациентов составило 13,4% от поступивших в отделение за данный период. Средний возраст пациентов - $58,0 \pm 19,72$ года (от 24 до 82 года, K-S $< 0,0001$). Женщины составили 46,4% (92 пациентки), средний койко/день в ОРИТ $14,88 \pm 3,36$ дня (от 1 до 48 сут, K-S $< 0,0001$). Распределение пациентов по локализации очагов инфекции представлено в табл. 1.

У пациентов проведено 297 бактериологических исследований. Количество исследований на 1 пациента составляло от 1,12 до 1,9. Характер исследуемого биоматериала определялся предполагаемым источником инфекционного воспаления (табл. 2).

Выявлено 17 видов микроорганизмов. По структуре из всех микроорганизмов грамположительная микрофлора выделена в 40,4% случаев, в 48,5% грамотрицательная, в 11,1% случаев выделены дрожжеподобные грибы (табл. 3).

Таблица 2

Характер исследуемого биоматериала у исследуемых пациентов

Биоматериал	Количество исследований
БАЛ	110
Дренажное отделяемое	111
Моча	28
Кровь	21
Центральный катетер	14
Мокрота	13

Таблица 3

Частота выявления микроорганизмов в исследуемой группе пациентов

Возбудитель	Абсолютное количество высево
<i>Acinetobacter baumannii</i>	45
<i>Aeromonas caviae</i>	1
<i>Candida albicans</i>	20
<i>Candida kefyr</i>	2
<i>Corynebacterium striatum</i>	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	17
<i>Enterococcus faecium</i>	14
<i>Escherichia coli</i>	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
<i>Proteus mirabilis</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	22
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7
<i>Streptococcus anginosus</i>	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3

Клинико-лабораторные данные исследуемой группы пациентов

Исследуемые переменные	M	SD	95% CI	nd
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	14,08	6,350	от 0,300 до 42,00	<0,0001
Лимфоциты, %	8,17	4,791	от 00,0 до 31,00	<0,0001
Тромбоциты, $\times 10^9$ /л	202,97	117,208	от 11,0 до 713,00	<0,0001
СРБ, мг/л	121,60	84,880	от 2,79 до 323,00	<0,0001
Pct, нг/мл	10,183	19,43	от 0,12 до 90,20	<0,0001
SOFA, балл	6,503	2,0455	от 4,00 до 12,00	<0,0001

Таблица 5

Показатели основного обмена исследуемой группы пациентов

Исследуемые показатели основного обмена	M	SD	nd
Углеводы, г	247,41	212,713	<0,0001
Углеводы, %	67,813	69,086	<0,0001
Жиры, г	40,770	122,755	0,0004
Жиры, %	23,093	92,337	<0,0001
Белки, г	106,54	43,202	<0,0001
Белки, %	22,80	16,644	<0,0001
REE, ккал/сутки	1860,00	597,293	0,0106
RQ	0,926	0,198	<0,0001
Ккал/кг	24,892	11,315	<0,0001

Таблица 6

Данные ROC-анализа: данные пациента, возбудителя и ближайший прогноз заболевания

Переменные	AUC	SE ^a	95% CI ^b	p
Пациент				
пол	0,532	0,046	от 0,450 до 0,612	0,499
возраст	0,512	0,047	от 0,430 до 0,593	0,800
Возбудитель				
Вид возбудителя	0,515	0,046	от 0,433 до 0,596	0,755
Госпитальная/негоспитальная	0,522	0,039	от 0,440 до 0,603	0,583
Грампринадлежность	0,501	0,041	от 0,419 до 0,582	0,983

^a DeLong et al., 1988; ^b AUC \pm 1.96 SE.

Таблица 7

Данные ROC-анализа: клинико-лабораторные данные и ближайший прогноз заболевания

Исследуемая переменная 1	SOFA
Исследуемая переменная 2	Pct, нг/мл
Классификационная переменная	Исход
Количество исследований	198
Положительный результат ^a	88 (44,44%)
Отрицательный результат ^b	110 (55,55%)

^aИсход=1; ^bИсход=0

Переменные	AUC	SE ^a	95% CI ^b	Yi	p
SOFA, баллы	0,829	0,0457	от 0,739 до 0,918	0,683	<0,0001
Pct, нг/мл	0,761	0,0576	от 0,648 до 0,874	0,5270	<0,0001

^a DeLong et al., 1988; ^b AUC \pm 1.96 SE; Yi-индекс Юдена.

Госпитальные штаммы среди всех выделенных микроорганизмов составили 61,9%. Эмпирическая антибактериальная терапия назначалась в момент поступления до выявления возбудителя. Инверсия на

целенаправленную антибактериальную терапию, с учётом результатов чувствительности к антибиотикам, проведена через 48 час.

Лабораторные данные исследуемой группы пациен-

Данные ROC-анализа: показатели основного обмена & ближайший прогноз заболевания

Исследуемая переменная 1	Ккал/кг				
Исследуемая переменная 2	Белки, %				
Классификационная переменная	Исход				
Количество исследований	198				
Положительный результат ^a	108 (54,54%)				
Отрицательный результат ^b	90 (45,45%)				
^a Исход=1; ^b Исход=0					
Переменные	AUC	SE ^a	95% CI ^b	Yi	p
Ккал/кг	0,584	0,0638	от 0,458 до 0,709	0,2826	0,0449
Белки, %	0,794	0,0459	от 0,704 до 0,884	0,4924	<0,0001

^a DeLong et al., 1988; ^b AUC ± 1.96 SE; Yi-индекс Юдена.

Данные ROC-анализа: клиничко-лабораторные и метаболические показатели, ближайший прогноз заболевания

Исследуемая переменная 1	SOFA				
Исследуемая переменная 2	Pct				
Исследуемая переменная 3	Белки, %				
Исследуемая переменная 4	Ккал/кг				
Классификационная переменная	Исход				
Количество исследований	198				
Положительный результат ^a	110 (55,56%)				
Отрицательный результат ^b	88 (44,44%)				
^a Исход=1; ^b Исход=0					
Исследуемые переменные	AUC	SE ^a	95% CI ^b	Yi	p
Pct, нг/мл	0,850	0,0770	от 0,699 до 1,000	0,5270	<0,0001
Белки, %	0,844	0,0754	от 0,697 до 0,992	0,4924	<0,0001
SOFA, баллы	0,656	0,112	от 0,436 до 0,875	0,2792	<0,0001
Ккал/кг	0,575	0,147	от 0,287 до 0,863	0,2826	0,0444

^a DeLong et al., 1988; ^b AUC ± 1.96 SE; Yi-индекс Юдена.

тов и оценка по шкале SOFA представлены в табл. 4.

Показатели основного обмена исследуемой группы пациентов представлены в табл. 5.

При используемой стратегии антибактериальной терапии статистический анализ не выявил зависимости ближайшего прогноза заболевания от возраста, пола пациентов, тинкториальных свойств бактерий, отношения к госпитальной микрофлоре (табл. 6).

Логистический анализ (ROC-анализ) позволил выявить клиничко-лабораторные данные, с достоверным влиянием на ближайший прогноз: тяжесть состояния пациента по шкале SOFA, уровень Pct (табл. 7).

Результатом аналогичного статистического поиска из данных метаболического статуса позволил выявить достоверные параметры: потребность в килокалориях на килограмм фактической массы тела и процент белковых калорий (табл. 8)

Наибольший интерес представила сравнительная значимость всех выявленных предикторов в ближайшем прогнозе заболевания (табл. 9)

Обеспечение нутритивной поддержки является одним из чрезвычайно важных моментов в поддержании основных физиологических функций пациента и коррективки метаболизма. Сочетанное применение донаторов энергетического и пластического материа-

ла позволяет достичь синтеза белка как окончательного результата нутритивной поддержки.

Выводы

Процент калорий, получаемых за счёт метаболизма белка, в основном обмене имеет высокую достоверную прогностическую ценность ближайшего прогноза заболевания у пациентов ОРИТ с наличием бактериального воспаления;

Результаты исследования подтверждают важность адекватной нутриционной терапии в лечении пациентов с инфекционным воспалительным синдромом, включающим расчёт и коррекцию белковых потерь и суммарных суточных калорий.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Russotto V., Cortegiani A., Raineri S.M., Giarratano A. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *J. Intensive Care*. 2015; 3: 54.
2. Руднов В.А., Бельский Д.В., Дехнич А.В.. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2011; 13 (4): 294-303.

3. Бaгненкo С.Ф., Шляпникoв С.А., Федoрoвa В.В., Зуевa Л.П., Колoсoвскaя Е.Н., Сaвинa В.А. Распрoстрaненнoсть инфeкци в oтделeниях рeaнимaции и интeнсивнoй тeрaпии Сaнкт-Пeтeрбургскoгo нaучнo-исслeдoвaтeльскoгo института скорoй пoмoщи им. И.И. Джaнeлидзe. *Инфeкци в хирургии*. 2012; 1: 3-7.
4. Pierrakos J.L. Vincent Sepsis biomarkers: a review The electronic version of this article is the complete one and can be found online at: <http://ccforum.com/content/14/1/R15>.
5. Wacker C., Prkno A., Brunkhorst F.M., Schlattmann P. Procalcitonin as adiaagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13: 426–35.
6. Tromp M, Lansdorp B, Bleeker-Rovers CP, Gunnewiek JM, Kullberg BJ, Pickkers P: Serial and panel analyses of biomarkers do not improve the prediction of bacteremia compared to one procalcitonin measurement. *J. Infect.* 2012; 65: 292–301.
7. Su C.P., Chen T.H., Chen S.Y., Ghang W.C., Wu G.H., Sun H.Y. et al. Predictive model for bacteremia in adult patients with blood cultures performed at the emergency department: a preliminary report. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2011; 44: 449–55.
8. Cavallazzi R., Bennin C.L., Hirani A., Gilbert C., Marik P.E. Is the band count useful in the diagnosis of infection? An accuracy study in critically ill patients. *J. Intensive Care Med.* 2010; 25: 353–7.
9. Venet F., Lepape A., Debard A.L., Bienvenu J., Bohe J., Monneret G. The Th2 response as monitored by CRTH2 or CCR3 expression is severely decreased during septic shock. *Clin. Immunol.* 2004; 113: 278-84.
10. De Freitas I., Fernandez-Somoza M., Essendorf-Sekler E., Cardier J.E. Serum levels of the apoptosis-associated molecules, tumor necrosis factor- α /tumor necrosis factor type-I receptor and Fas/FasL, in sepsis. *Chest.* 2004; 125: 2238-46.
11. Tsao P.N., Chan F.T., Wei S.C., Hsieh W.S., Chou H.C., Su Y.N. et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 protects mice in sepsis. *Crit. Care Med.* 2007; 35: 1955-60.
12. Williams D.L., Ha T., Li C., Kalbfleisch J.H., Schweitzer J., Vogt W., Browder I.W. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit. Care Med.* 2003; 31:1808-18.
- ICUs: results of a national multicenter research. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2011; 13(4): 294-303. (in Russian)
3. Bagnenko S.F., Shlyapnikov S.A., Fedorova V.V., Zueva L.P., Kolosovskaya E.N., Savina V.A. The prevalence of infection in intensive care units of the St. Petersburg research Institute of emergency care. I. I. Janelidze. *Infektsii v khirurgii.* 2012; 1: 3-7. (in Russian)
4. Pierrakos J.L. Vincent Sepsis biomarkers: a review The electronic version of this article is the complete one and can be found online at: <http://ccforum.com/content/14/1/R15>.
5. Wacker C., Prkno A., Brunkhorst F.M., Schlattmann P. Procalcitonin as adiaagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13: 426–35.
6. Tromp M, Lansdorp B, Bleeker-Rovers CP, Gunnewiek JM, Kullberg BJ, Pickkers P: Serial and panel analyses of biomarkers do not improve the prediction of bacteremia compared to one procalcitonin measurement. *J. Infect.* 2012; 65: 292–301.
7. Su C.P., Chen T.H., Chen S.Y., Ghang W.C., Wu G.H., Sun H.Y. et al. Predictive model for bacteremia in adult patients with blood cultures performed at the emergency department: a preliminary report. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2011; 44: 449–55.
8. Cavallazzi R., Bennin C.L., Hirani A., Gilbert C., Marik P.E. Is the band count useful in the diagnosis of infection? An accuracy study in critically ill patients. *J. Intensive Care Med.* 2010; 25: 353–7.
9. Venet F., Lepape A., Debard A.L., Bienvenu J., Bohe J., Monneret G. The Th2 response as monitored by CRTH2 or CCR3 expression is severely decreased during septic shock. *Clin. Immunol.* 2004; 113: 278-84.
10. De Freitas I., Fernandez-Somoza M., Essendorf-Sekler E., Cardier J.E. Serum levels of the apoptosis-associated molecules, tumor necrosis factor- α /tumor necrosis factor type-I receptor and Fas/FasL, in sepsis. *Chest.* 2004; 125: 2238-46.
11. Tsao P.N., Chan F.T., Wei S.C., Hsieh W.S., Chou H.C., Su Y.N. et al. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 protects mice in sepsis. *Crit. Care Med.* 2007; 35: 1955-60.
12. Williams D.L., Ha T., Li C., Kalbfleisch J.H., Schweitzer J., Vogt W., Browder I.W. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. *Crit. Care Med.* 2003; 31:1808-18.

REFERENCES

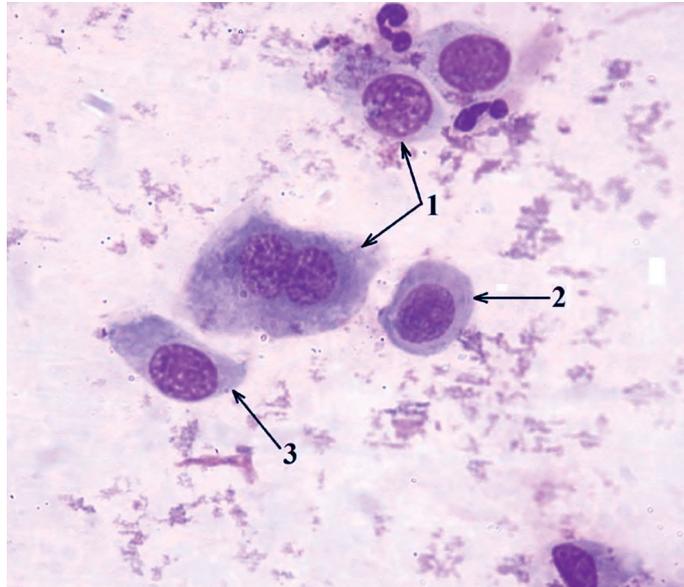
1. Russotto V., Cortegiani A., Raineri S.M., Giarratano A. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *J. Intensive Care.* 2015; 3: 54.
2. Rudnov V.A., Belski D.V., Dekhnich A.V. Infections in Russian

Пoстyпила 17.01.19
Пpинята к пeчaти 22.01.19

Уважаемые читатели!

На сайте Научной Электронной Библиотеки **www.elibrary.ru** можно подписаться на электронную версию нашего журнала и других журналов издательства «Медицина» на 2019 год.

Архив журналов Издательства «Медицина» находится в открытом (бесплатном) доступе на сайтах Научной электронной библиотеки **www.elibrary.ru** и Киберленинки **www.cyberleninka.ru**



Риноцитогамма. Окраска азур-эозином. Увеличение 10×100.

1 – дегенеративные (дистрофические) изменения. Потеря ресничек, вакуолизация ядра и цитоплазмы, гипохромия, оксифилия, нечеткость контуров цитоплазмы вплоть до полного ее разрушения с появлением «голых» ядер, кариолизис.

2 – плоскоклеточная метаплазия. Клетки округлой, овальной, полигональной формы, небольших размеров, ядро в центре, ядерно-цитоплазматическое соотношение 1/1, 1/2.

3 – цилиндрический эпителий.