

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.

# Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 64  
7 • 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

ИЮЛЬ

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 03.07.2019.

Подписано в печать 20.07.2019.

Формат 60 × 88½.

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](http://www.wakc.ru),

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

Подписка на электронную версию:  
[elibrary.ru](http://elibrary.ru)

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.  
2019. № 7. 385–448.

**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 ИЗДАТЕЛ'СТВО  
"МЕДИЦИНА"

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

# D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 64  
7 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JULY

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:  
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow  
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:

8-495-430-03-63,

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

**Managing editor L.A. Shankina**

**ADVERTISING DEPARTMENT**

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

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

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

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

**EDITOR BOARD:**

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

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

**EDITORIAL COUNCIL:**

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



ИЗДАТЕЛ'СТВО "МЕДИЦИНА"

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

## БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Рожкова Т.А., Амелюшкина В.А., Кухарчук В.В., Котловский М.Ю., Якименко А.В., Курдюк Е.В.** Липолиз в липопротеинах очень низкой плотности – *locus minoris resistencia* – в патогенезе гипертриглицеридемии. позитивное действие диеты, полиеновых жирных кислот, статинов и фибратов ..... 388
- Потеряева О.Н., Усынин И.Ф.** Диагностическое значение и регуляторные функции проинсулина ..... 397
- Овчинников А.Н., Дерюгина А.В.** Ротовая жидкость как высокоинформативный субстрат неинвазивного исследования процессов липопероксидации и повреждения мышечной ткани у высококвалифицированных спортсменов в условиях физических нагрузок ..... 405

## ИММУНОЛОГИЯ

- Марданлы С.Г.** К вопросу о стандартизации условий производства компонентов и постановки реакции иммунофлюоресценции на примере лабораторной диагностики сифилиса ..... 409
- Янушевич О.О., Духовская Н.Е., Островская И.Г., Вавилова Т.П., Ахмедов Г.Д., Новикова Т.М., Шашковская В.С., Спиридонова В.А.** Исследование количества интерлейкина-6 методами sds-паг электрофореза и иммуноферментного анализа в смешанной слюне после ополаскивания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к интерлейкину-6 ..... 413
- Петелина Т.И., Авдеева К.С., Быкова С.Г., Мусихина Н.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А., Зуева Е.В., Леонович С.В., Лыцова Н.Л.** Неспецифические параметры иммунного ответа как звено в патогенезе ремоделирования сосудистой стенки и деструкции костной ткани у женщин с артериальной гипертензией в постменопаузе ..... 417

## МИКРОБИОЛОГИЯ

- Шутикова А.Л., Леонова Г.Н., Лубова В.А.** Молекулярно-генетический мониторинг как основа современного эпидемиологического надзора за клещевыми инфекциями ..... 424
- Харсеева Г.Г., Мангуттов Э.О., Бут О.М., Чепусова А.В., Алутина Э.Л.** Анализ частоты выделения недифтерийных коринебактерий от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта ..... 430
- Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Миронов А.Ю., Борисова О.Ю., Бурбелло А.Т.** Маркёры воспаления и инфекция кровотока (обзор литературы) ..... 435

## ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

- Марданлы С.Г.** Состояние и перспективы развития отечественного рынка медицинских изделий для диагностики *in vitro* в сегменте диагностических реагентов и их наборов ..... 443

## НЕКРОЛОГ

- Памяти профессора Владимира Николаевича Титова ..... 443

## BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Rozhkova T.A., Amelyshkina V.A., Kukharchuk V.V., Kotlovsky M.Yu., Yakimenko A.V., Kurdyak E.V.** Lipolysis in very low density lipoproteins – *locus minoris resistenciae* – in the pathogenesis of hypertriglyceridemia. positive effects of diet, polyenic fatty acids, statins and fibrates ..... 388
- Poteryaeva O.N., Usynin I.F.** Diagnostics value and regulatory functions of proinsulin ..... 397
- Ovchinnikov A.N., Deryugina A.V.** Saliva as highly informative substrate for non-invasive analysis of lipoperoxide processes and muscle damage in highly skilled athletes ..... 405

## IMMUNOLOGY

- Mardanly S.G.** Standardization of component manufacturing conditions and setting up the immunofluorescence reaction on the example of syphilis laboratory diagnostics ..... 409
- Yanushevish O.O., Dukhovskaya H.E., Ostrovskaya I.G., Vavilova T.P., Akhmedov G.D., Novikova T.M., Shashkovskaya B.C., Spiridonova V.A.** Study of the quantity of interleukin-6 by sds-paag electrophoresis and immuno-enzyme analysis in mixed saliva after rinsing the oral cavity with oligonucleotide specific by interleukin-6 ..... 413
- Petelina T.I., Avdeeva K.S., Bykova S.G., Musikhina N.A., Gapon L.I., Gorbatenko E.A., Zueva E.V., Leonovich S.V., Lystsova N.L.** Non-specific parameters of immune response as a ring in the pathogenesis of remodeling of the vascular wall and destruction of bone tissue in women with arterial hypertension in postmenapaus ..... 417

## MICROBIOLOGY

- Shutikova A. L., Leonova G. N., Lubova V. A.** Molecular-genetic monitoring as the basis of modern epidemiological surveillance of tick-born infections ..... 424
- Kharseeva G.G., Mangutov E.O., But O.M., Chepusova A.V., Alutina E.L.** Analysis of the frequency of isolation of Corynebacteria non-diphtheria from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract ..... 430
- Kargaltseva N.M., Kotcherovets V.I., Mironov A.Yu., Borisova O.Yu., Burbello A.T.** Inflammation markers and bloodstream infection (review of literature) ..... 435

## LABORATORY SERVICE OF ORGANIZATION

- Mardanly S.G.** Current state and development trends of domestic medical device market for *in vitro* diagnostics in the segment of diagnostic reagents and their kits ..... 443

## OBITUARY

- In memory of professor Vladimir Nikolaevich Titov ..... 443

## БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Титов В.Н.<sup>1</sup>, Рожкова Т.А.<sup>1</sup>, Амелюшкина В.А.<sup>1</sup>, Кухарчук В.В.<sup>1</sup>, Котловский М.Ю.<sup>2</sup>, Якименко А. В.<sup>2</sup>, Курдоjak Е.В.<sup>2</sup>

### ЛИПОЛИЗ В ЛИПОПРОТЕИНАХ ОЧЕНЬ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ – *LOCUS MINORIS RESISTENCIA* – В ПАТОГЕНЕЗЕ ГИПЕРТРИГЛИЦЕРИДЕМИИ. ПОЗИТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИЕТЫ, ПОЛИЕНОВЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, СТАТИНОВ И ФИБРАТОВ

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, 121552, Москва, Россия;  
<sup>2</sup>ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава РФ, Красноярск

*Ингибирование гидролиза пальмитиновых и олеиновых триглицеридов (ТГ) в липопротеинах (ЛП) очень низкой плотности (ЛПОНП), медленное формирование активной конформации apoB-100, блокада образования apoE/B-100 лиганда в ЛПОНП и снижение поглощения их инсулинозависимыми клетками – причина гипертриглицеридемии (ГТГ). Пальмитиновые и олеиновые ЛПОНП (> 80% всех ЛПОНП) не превращаются в ЛП низкой плотности (ЛПНП). Атеросклероз – не алиментарный дефицит полиеновых жирных кислот (ПНЖК), а формирования in vivo низкой биодоступности ПНЖК для клеток в ЛПНП при высоком содержании в пище пальмитиновой НЖК и пальмитиновых ЛПНП. Сколь высок ХС-ЛПНП, столь же велико содержание в плазме крови ПНЖК и столь же велик дефицит их в клетках. Основу первичной профилактики атеросклероза составляет уменьшение в пище содержания пальмитиновой насыщенной ЖК, транс-форм ЖК при умеренном увеличении ПНЖК. Трудно полагать, что чуждые для организма ксенобиотики статины, фибраты, пробукол, могут проявлять in vivo биологическое, плейотропное действие. Физиологично in vivo это удел ранних в филогенезе гуморальных медиаторов эйкозаноидов: простагландины, тромбоксаны, лейкотриены и резольвины. Это производные арахидоновой, эйкозапентаеновой докозагексаеновой ПНЖК. Реально полагать, что, действуя по единому алгоритму, активируя гидролиз ТГ в ЛПОНП, все препараты в итоге нормализуют поглощение клетками ПНЖК в линолевых и линоленовых ЛПНП путем apoB-100-эндоцитоза. Атеросклероз – синдром дефицита в клетках эссенциальных полиеновых жирных кислот.*

**Ключевые слова:** гипертриглицеридемия; полиеновые жирные кислоты; пальмитиновая кислота; атеросклероз; статины; фибраты.

**Для цитирования:** Титов В.Н., Рожкова Т.А., Амелюшкина В.А., Кухарчук В.В., Котловский М.Ю., Якименко А.В., Курдоjak Е.В. Липолиз в липопротеинах очень низкой плотности - locus minoris resistencia в патогенезе гипертриглицеридемии. Позитивное действие диеты, полиеновых жирных кислот, статинов и фибратов. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64(7): 388-396. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-388-396>

Titov V.N.,<sup>1</sup> Rozhkova T.A.,<sup>1</sup> Amelyshkina V.A.,<sup>1</sup> Kukharchuk V.V.,<sup>1</sup> Kotlovsky M.Yu.,<sup>2</sup> Yakimenko A.V.,<sup>2</sup> Kurdojak E.V.<sup>2</sup>

LIPOLYSIS IN VERY LOW DENSITY LIPOPROTEINS - LOCUS MINORIS RESISTENTIAE – IN THE PATHOGENESIS OF HYPERTRIGLYCERIDEMIA. POSITIVE EFFECTS OF DIET, POLYENIC FATTY ACIDS, STATINS AND FIBRATES

<sup>1</sup> Russian Cardiology Research-and-Production Center, Ministry of Health, Moscow;

<sup>2</sup> Krasnoyarsk V.F. Voyno-Yasenetsky State Medical University, Ministry of Health, Krasnoyarsk

*Inhibition of hydrolysis of palmitic and oleic triglycerides (TG) in very low density lipoproteins (VLDL), slow formation of active apoB-100 conformation, blockade of apoE/B-100 ligand formation in VLDL and their reduced uptake by insulin-dependent cells cause hypertriglyceridemia (HTG). Palmitic and oleic VLDL (>80% total VLDL) are not converted in low density lipoproteins (LDL). Atherosclerosis is not an alimentary deficiency of polyenic fatty acids (PFA), but results from low in vivo bioavailability of PFA in LDL against the background of high dietary palmitic FA and palmitic LDL. Plasma PFA content and cellular PFA deficiency are as high as LDL cholesterol (CL). Primary prevention of atherosclerosis should be based on a decrease in dietary content of palmitic saturated FA, trans FA and a moderate increase in PFA. It seems highly unlikely that the xenoiotics statins, fibrates and probucol produce pleiotropic biological effects in vivo. These effects are brought about by phylogenetically early humoral mediators eicosanoids: prostacyclins, prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and resolvins. It is reasonable to suggest that all preparations which act according to the same algorithm activate TG hydrolysis in VLDL and normalize cellular uptake of PFA in linoleic and linolenic LDL via apoB-100 endocytosis. Atherosclerosis is a syndrome of cellular deficiency of essential polyenic FA.*

**Key words:** hypertriglyceridemia; polyenic fatty acids; palmitic acid; atherosclerosis; statins; fibrates.

**For correspondence:** Titov V. N., doctor of medical sciences, professor, Russian Cardiology Research-and-Production Center, Ministry of Health, Moscow, 121552; e-mail: [vn\\_titov@mail.ru](mailto:vn_titov@mail.ru)

**For citation:** Titov V.N., Rozhkova T.A., Amelyshkina V.A., Kukharchuk V.V., Kotlovsky M.Yu., Yakimenko A.V., Kurdoyak E.V. Lipolysis in very low density lipoproteins - locus minoris resistentiae – in the pathogenesis of hypertriglyceridemia. Positive effects of diet, polyenic fatty acids, statins and fibrates. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64(7): 388-396. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-388-396>

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

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

Received 09.08.2018  
Accepted 01.09.2018

Согласно филогенетической теории общей патологии, система липопротеинов (ЛП), формирование которой происходило с ранних ступеней филогенеза, состоит последовательно из ЛП высокой плотности (ЛПВП) + ЛП низкой плотности (ЛПНП) + ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП). ЛП предназначены для переноса в гидрофильной межклеточной среде, в лимфо-, гемолимфо- кровотоке и пассивного, активного поглощения клетками жирных кислот (ЖК) [1, 2]. Субстратом питания самых ранних, одноклеточных, экзотрофов Архей был, более вероятно, С2 – ацетат химического происхождения, циклический диацетат – С4; по сути кетоновые тела. Позже, по мере развития одноклеточных, субстратами для питания Архей стали короткоцепочечные ЖК, через миллионы лет ими стали глюкоза и длинноцепочечные ЖК С16-С20. Растения и животные синтезируют более 800 индивидуальных ЖК; в метаболизме приматов и человека их около 20 [3].

Различие физико-химических свойств ЖК определено несколькими факторами: а) длина ЖК – число атомов углерода в цепи; б) количество двойных связей (ДС) (-С = С-); в) расположение ДС по дине ЖК и г) цис- и трансконфигурация ЖК. ЖК полярные. Они формируют моно-, би-, мультислойные структуры (жидкие кристаллы), но переносить их в крови как полярные липиды не оптимально, а поглощение клетками полярных липидов – процесс медленный. Полярные ЖК не могут преодолеть в плазматической мембране клеток бислоя полярных фосфолипидов (ФЛ). Клетки поглощают полярные ЖК в ассоциации с CD36-рецептором; однако роль их в снабжении субстратами невелика. Позже в филогенезе ЛП стали переносить, а клетки поглощать ЖК в форме неполярных липидов. По строению ЛП – бислоя белок: липид; в нем специфичные липидпереносящие белки аполипопротеины (апо) связывают доменами разные по гидрофобности липиды, формируя разную структуру бислоя белок : липид: апоА-I ЛПВП из полярных липидов (ФЛ + диглицериды), апоВ-100 ЛПНП и ЛПОНП из неполярных липидов (триглицериды, ТГ + эфиры спирта холестерина, ЭХС).

*Становление в филогенезе ЛП – переноса и поглощения клетками ЖК.* Неполярные липиды формируются *in vivo* в реакции этерификации ЖК со спиртами; на ступенях филогенеза ими стали гидрофильный, трехатомный спирт глицерин и гидрофобный, одноатомный, циклический спирт холестерин. Состав ЛП включает: 1) Апо, который, связывая липиды, формирует ЛП; 2) переносимые насыщенные ЖК (НЖК) не имеют ДС; моносатуренные ЖК (МЖК) с одной ДС; ненасыщенные ЖК (ННЖК) с 2–3 ДС и полиеновые ЖК (ПНЖК) с 4–6 ДС; 3) спирт глицерин, который этерифицирует С16–С18 НЖК, МЖК и ННЖК в форму эфиров глицерина – глицеридов. Спирт ХС, который этерифицирует С20 ННЖК и ПНЖК в форму полиеновых эфиров холестерина

(поли-ЭХС). ХС-ЛПНП – это количество ХС, которым в крови этерифицированы ПНЖК; ХС-ЛПНП эквивалентно, косвенно отражает содержание в крови ПНЖК. При атеросклерозе, при снижении биодоступности для клеток ЛПНП с переносимыми ПНЖК, при ретенции (задержке) ХС-ЛПНП в межклеточной среде – в плазме крови, в клетках формируется дефицит ПНЖК. Атеросклероз, в нашем представлении, – это синдром внутриклеточного дефицита ПНЖК.

Первыми в межклеточной среде ЖК к клеткам стал переносить апоА-I и ЛПВП; связывающая способность апо низкая; он связывает и переносит ЖК в форме только полярных эфиров со спиртом глицерином: это полярные фосфолипиды (ФЛ) с ННЖК + ПНЖК и полярные диглицериды с НЖК + МЖК. Клетки поглощают ЖК из ЛПВП пассивно: это физико-химические и биохимические реакции переэтерификации между ФЛ в ЛПВП и ФЛ наружного монослоя плазматической мембраны. Далее ЖК по механизму «флип-флоп» переходят во внутренний монослой бислоя мембраны и в цитоплазму. В течение миллионов лет в филогенезе *in vivo* клетки поглощали ЖК только пассивно или активировано. Со временем в филогенезе переноса ЖК в форме полярных липидов и пассивного поглощения клетками ЖК оказалось недостаточно.

Через миллионы лет на ступенях филогенеза новые клетки – гепатоциты синтезировали изобелки апоВ-48 и апоВ-100; они-то и сформировали перенос НЖК + МЖК + ННЖК в неполярных ТГ последовательно в ЛПОНП → ЛПНП. На ранних ступенях филогенеза все ЛПОНП превращались в ЛПНП. Одновременно клетки сформировали активное поглощение лигандных ЛПНП путем апоВ-100-эндоцитоза. В течение последующих миллионов лет активное поглощение клетками НЖК + МЖК + ННЖК сочеталось с пассивным поглощением ПНЖК. Далее на основе единой технологии становления в филогенезе функциональных систем, активное поглощение клетками ПНЖК сформировалось сходно с более ранним поглощением иных ЖК – активным апоВ-100-эндоцитозом. Для этого: а) в ЛПВП происходит переэтерификация ПНЖК из полярных ФЛ в неполярные поли-ЭХС; б) вновь синтезированный белок переносящий поли-эфиры холестерина (БПЭХ) формирует тройственный ассоциат ЛПВП + БПЭХ + ЛПНП; в) в нем ПНЖК в форме поли-ЭХС спонтанно, по градиенту концентрации, переходят из ЛПВП в ЛПНП, далее г) клетки поглощают ПНЖК – поли-ЭХС в составе ЛПНП. Через миллионы лет в становлении биологической функции локомоции произошло формирование последних в филогенезе ЛП – ЛПОНП. Одновременно с этим в филогенезе сформировалась система инсулина [4].

Функция локомоции – движение за счет сокращения поперечнополосатых, скелетных миоцитов. Это реализация новых способов добывания пищи (догонять и

убегать), миграций, перелетов для нахождения пищи и в целях продолжения вида. Биологическая роль инсулина оформилась, как обеспечение энергией биологической функции локомоции. Реализация этой функции потребовала: инициировать активность  $\beta$ -клеток и, вместо инсулиноподобного фактора роста, начать синтез и депонирование инсулина; б) «модернизации» филогенетически ранних клеток-предшественников и формирование инсулинозависимых клеток, замкнутой системы кровообращения и сердца как филогенетически позднего центрального насоса. Инсулинозависимы поперечнополосатые миоциты, симпласт кардиомиоцитов, адипоциты, перипортальные адипоциты и клетки Купфера. Это структурно, функционально совершенные филогенетически поздние оседлые макрофаги, новое поколение макрофагов, которые располагаются в частности в интима артерий эластического типа. Ранние в филогенезе висцеральные жировые клетки (ВЖК) сальника, в отличие от адипоцитов, рецепторов к позднему в филогенезе инсулину не имеют; функция их от действия филогенетически позднего инсулина зависит в малой мере.

Инсулинозависимые клетки, масса скелетной мускулатуры и адипоцитов стали численно доминировать *in vivo*; для реализации функции локомоции необходимо векторное, направленное снабжение клеток большим количеством субстратов для наработки энергии, окисления в митохондриях, в первую очередь НЖК + МЖК и во вторую глюкозы. С целью векторного обеспечения инсулинозависимых клеток субстратами для наработки энергии инсулин инициировал на поздних ступенях филогенеза формирование нового класса ЛП – ЛПОИП. Среди 4 субклассов ЛПОИП (пальмитиновые, олеиновые, линолевые и линоленовые), которые формируют и секретируют гепатоциты, пальмитиновые и олеиновые ЛПОИП переносят к клеткам НЖК + МЖК в форме ТГ. Они-то и образовали новый, отдельный класс ЛПОИП; поглощать их стали инсулинозависимые клетки путем активного апоЕ/В-100-эндоцитоза. При этом пальмитиновые и олеиновые ЛПОИП ( $\approx 90\%$  всех ЛПОИП) в ЛПНП не превращаются. Однако, как и ранее в филогенезе, линолевые и линоленовые ЛПОИП превращаются в ЛПНП, перенося к клеткам ННЖК + ПНЖК. Все клетки поглощают ЛПНП путем сформированного ранее в филогенезе апоВ-100-эндоцитоза. При физиологической гипертриглицеридемии (ГТГ) после еды содержание в плазме крови ПНЖ + МЖК, ННЖК и ПНЖК соотносится  $\approx$  как 100 : 10 : 1. Преобладание в плазме крови олеиновых эндогенно синтезируемых ЖК, ТГ и ЛПОИП обеспечивает регуляция инсулином.

После поглощения клетками пальмитиновых + олеиновых ЛПОИП ( $\approx 90\%$  всех ЛПОИП) в крови остаются линолевые + линоленовые ЛПОИП; это  $\approx 10\%$  секретированных гепатоцитами ЛПОИП. В них БПЭХ [5], который мы предлагаем более точно называть «белок, переносящий полиеновые эфиры холестерина» (БППЭХ), активирует переход из ЛПВП всех ПНЖК в форме поли-ЭХС; более гидрофобные, чем ТГ, и меньшие в размерах поли-ЭХС, активируя гидролиз ТГ в линолевых и линоленовых ЛПОИП, превращают их в одноименные ЛПНП. Липолиз в линолевых и линоленовых ЛПОИП активирует печеночная липаза и кофактор апоС-III. Переход поли-ЭХС из ЛПВП служит облигатным условием гидролиза ТГ в ЛПНП, образования активной конформации апоВ-100, образования лигандных ЛПНП и поглощение клетками апоВ-100-эндоцитозом [6]. Переход

малого количества поли-ЭХС из ЛПВП в линолевые и линоленовые ЛПВП – причина повышения ХС-ЛПНП.

Функционально более рационально, мы полагаем, заменить термин «белок, переносящий эфиры холестерина» (БПЭХ) на «белок, переносящий полиеновые эфиры холестерина» (БППЭХ). В ЛПВП на ступенях филогенеза одновременно стал происходить синтез двух ЭХС: поли-ЭХС и моно-ЭХС, холестерололеат. Функционально поли-ЭХС – неполярная форма ПНЖК, этап переноса и активного поглощения клетками ПНЖК. Функционально моно-ЭХС – неполярная форма спирта ХС в реверсивном переносе его от клеток к гепатоцитам. БППЭХ переносит из ЛПВП в линолевые и линоленовые ЛПОИП только поли-ЭХС и не затрагивает моно-ЭХС. Забвение этого различия и функционально неопределенный термин БПЭХ приводит к функциональным ошибкам. Далеко не отдельные авторы связывают действие БПЭХ с реверсивным переносом моно-ЭХС из ЛПВП и, желая поддержать в крови высокий уровень ХС-ЛПВП, начинают БПЭХ ингибировать. На самом же деле авторы ингибируют поглощение клетками ПНЖК в форме поли-ЭХС. И не удивительно, что в протокольных исследованиях при использовании ингибиторов БППЭХ, получают негативные результаты; афизиологичное воздействие и в клинике не может быть позитивным. Столь же афизиологичны и попытки ингибировать синтез в цитозоле клеток, в эндоплазматической сети микросомальный белок, переносящий ТГ [7].

*Locus minoris resistencia формирования гипертриглицеридемии – липолиз пальмитиновых ТГ в ЛПОИП.* За миллионы лет до того, как в филогенезе произошел синтез инсулина, регуляция метаболизма глюкозы была завершена; для инсулина места не осталось. Инсулин, согласно филогенетической теории общей биологии, стал регулировать метаболизм субстратов для наработки клетками энергии, в первую очередь метаболизм ЖК и опосредованно, вторично, метаболизм глюкозы. Инсулин активирует поглощение инсулинозависимыми клетками экзогенной глюкозы через специфические глюкозные транспортеры ГЛЮТ4 с целью: а) пополнить запасы гликогена, в том числе и в перипортальных гепатоцитах; б) активировать липогенез *in situ de novo*; в) превратить всю экзогенную глюкозу вначале в пальмитиновую НЖК, далее – в олеиновую МЖК и депонировать в адипоцитах в олеиновых ТГ. Для этого инсулин экспрессирует синтез и выставление на плазматическую мембрану инсулинозависимых клеток ГЛЮТ4. Пул ВЖК сальника филогенетически является ранним, в то время как пул адипоцитов – филогенетически поздний [8]. И если пул ВЖК сальника и забрюшинной клетчатки задействован в реализации на ступенях филогенеза биологических функций трофологии, гомеостаза, биологической функции эндэкологии и функции адаптации, то пул филогенетически поздних адипоцитов предназначен для реализации одной биологической функции – функции локомоции?

Апо в ЛП переносят к клеткам только ЖК; спирты же глицерин и ХС – это «упаковочный материал»; спирты, этерифицируя ЖК, превращают их в неполярные липиды – ТГ и эфиры ХС, поли-ЭХС. После активного поглощения поли-ЭХС в ЛПНП клетка подвергает их гидролизу; ПНЖК остаются в клетке, а полярный ХС «за ненадобностью» клетки экскретируют в межклеточную среду. В ней полярный ХС связывает ЛПВП; на ранних ступенях филогенеза апоА-I ЛПВП доставляют поляр-

ный ХС к энтероцитам; последние обеспечивают его экскрецию. Когда на ступенях филогенеза количество ретроградно переносимого ХС возросло, иные апоА-I + апоА-II ЛПВП стали отвозить ХС от клеток к гепатоцитам не в форме полярного спирта, а в неполярной форме ЭХС, моно-ЭХС – холестерололеата. «ABC кассетные транспортеры» на мембране гепатоцитов поглощают ЛПВП целиком; в лизосомах их опорожняют от моно-ЭХС и выводят в кровотоки с целью продолжить реализацию биологической функции эндоекологии – поддержания «чистоты» межклеточной среды; полярный спирт ХС на аутокринном уровне служит «биологическим катаболитом».

В филогенезе ЛП задействованы в реализации разных функций; ранние, менее специализированные ЛПВП одновременно реализуют биологическую функцию трофологии, функцию гомеостаза, биологическую функцию эндоекологии и функцию адаптации при пассивном поглощении их клетками. Позже в филогенезе совместно ЛПНП + ЛПВП сформировали активное, рецепторное поглощение клетками всех ЖК. На 3-м этапе становления ЛП, при реализации биологической функции локомоции, ЛПОНП сформировались для реализации биологической функции локомоции, активное, рецепторное поглощение НЖК + МЖК только инсулинозависимыми клетками путем активного апоЕ/В-100-эндоцитоза. ГТГ без хиломикронемии (ХМ) является патологией инсулинозависимых ЛПОНП. Сахарный диабет – это патология не столько метаболизма глюкозы, сколько НЖК, наиболее часто пальмитиновой ЖК и пальмитинового варианта метаболизма ЖК, обеспечения клеток энергией в форме АТФ.

Патология физико-химических и биохимических превращений в ЛПОНП при переносе в плазме крови к клеткам формирует ГТГ без ХМ, ГЛП фенотипа II б и фенотипа (типа) IV [9]. Это – семейная комбинированная ГЛП и «чистая» ГТГ; однако подобные изменения могут развиваться и по иным причинам: а) в начальные сроки переядания; б) при гиперэстрогемии у женщин и в) приеме гормональных контрацептивов. Сочетание же ГТГ + ХМ формирует ГЛП фенотипа I и фенотипа V [10]. И если в патогенезе ГТГ фенотипов II б и IV врожденная патология апо не просматривается, при сочетании ГТГ + ХМ, этиологическим фактором оказывается наследственная патология апоЕ. При ГТГ без ХМ, фенотипе III (дислиппротеинемия) это обусловлено заменой физиологического фенотипа E3/E3 на афизиологичный E2/E2, а при ГТГ + ХМ фенотипа V – замещение физиологического фенотипа E3/E3 на афизиологичный E4/E4. Можно полагать, что более ранний в филогенезе, афизиологичный вариант – фенотип E4/E4 – причина нарушения поглощения гепатоцитами ХМ путем апоЕ/апоВ-48. Афизиологичный фенотип же E2/E2 определяет нарушение рецепторного поглощения клетками пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП путем активного апоЕ/В-100-эндоцитоза всеми инсулинозависимыми клетками.

Этиологический фактор ГТГ + ХМ, ГЛП фенотипа I – врожденная патология первичной структуры поздней в филогенезе постгепариновой липопропротеинлипазы (ЛПЛ), эндотелиальной ЛПЛ и/или ее кофактора апоС-II [11]. Постгепариновую ЛПЛ называют еще эндотелиальной, поскольку в период реализации биологической реакции эндотрофии при отсутствии в крови большого количества ЛПОНП фермент остается в крови. ЛПЛ + кофактор апоС-II связываются с цепями глюкозамино-

гликанов гликокаликса на поверхности эндотелия. Гепарин тучных клеток освобождает ЛПЛ из связи с гликокаликсом; это и послужило основанием термина постгепариновая ЛПЛ. Каково же формирование ГТГ + гиперХС – семейной комбинированной ГЛП при наиболее частом в популяции фенотипе II б и каково отношение частоты наследуемого фенотипа по сравнению с вторичным, приобретенным типом ГЛП II б.

*Биологическое предназначение печеночной липазы и кофактора апоС-III.* Физиологично гепатоциты секретуют пальмитиновые, олеиновые, линолевые и линоленовые ЛПОНП без активного лиганда, прелигандные; лиганда, который могут связать рецепторы плазматической мембраны клеток, на поверхности ЛПОНП нет. Это определено тем, что все ЛПОНП выходят в кровотоки функционально перегруженные ТГ. В филогенезе в линолевых и линоленовых ЛПОНП → ЛПНП, гидролиз избыточного количества ТГ в ассоциации с апоВ-100 осуществляет печеночная глицеролгидролаза (липаза) и ее кофактор апоС-III [12]. Гидролиз ТГ активируют ПНЖК, которые в форме поли-ЭХС при действии БППЭХ спонтанно, по градиенту концентрации, переходят из ЛПВП в линолевые и линоленовые ЛПОНП. Поли-ЭХС изменяют физико-химические свойства ЛПОНП, превращая их в одноименные ЛПНП. Когда в ассоциации с апоВ-100 остается оптимальное количество ТГ, апоВ-100 изменяет конформацию (стерическую, пространственную форму молекулы) и выставляет на поверхность ЛПНП апоВ-100-лиганд; образуются лигандные ЛПНП [13]. Связывая их одноименными рецепторами, клетки поглощают линолевые и линоленовые ЛПНП с переносимыми ими ПНЖК.

В реализации биологической функции локомоции гепатоциты секретуют в кровь почти на порядок большее пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП, чем линолевых + линоленовых. Поскольку пальмитиновые и олеиновые ЛПОНП сформировались в филогенезе позже ЛПНП, биохимические превращения их в крови активирует иная липаза – постгепариновая ЛПЛ (эндотелиальная ЛПЛ) + кофактор апоС-II. Когда в связи с апоВ-100 в ЛПОНП остается оптимальное количество пальмитиновых и олеиновых ТГ, апоВ-100 принимает активную конформацию и выставляет на поверхность ЛПОНП апоВ-100-лиганд, с которым ассоциируется апоЕ [14]; при этом формируется кооперативный апоЕ/В-100-лиганд и лигандные ЛПОНП. Связывая их одноименными рецепторами, все инсулинозависимые клетки поглощают НЖК + МЖК в форме ТГ в ЛПОНП активным апоЕ/В-100-эндоцитозом. Таким образом, пальмитиновые и олеиновые ЛПОНП поглощают клетки до того, как они превратятся в ЛПНП. Физиологично в крови натошак не бывает ни пальмитиновых, ни олеиновых ЛПНП.

В статьях и руководствах по ГЛП говорится, что в крови гидролиз ТГ в ЛПОНП при действии постгепариновой (эндотелиальной) ЛПЛ и апоС-II как кофактора приводит к образованию ЛПНП; однако это относится только к линолевым и линоленовым ЛПОНП. Гидролиз в них ТГ продолжается при действии уже иной липазы печеночной глицеролгидролазы (липазы) и иного кофактора апоС-III [15]. Авторы полагают, что содержание в плазме крови апоС-II можно рассматривать как тест активации гидролиза ТГ в ЛПОНП, одновременно повышение концентрации апоС-III – тест ингибирования гидролиза ТГ в ЛПНП. Некоторые авторы рассматривают апоС-III как ингибитор липолиза ТГ в ЛПНП, который

препятствует поглощению клетками ЛПНП и переносимые ими ПНЖК. Мы полагаем, подобное мнение абилочно; экзотрофы полностью зависимы от экзогенной пищи и не формируют ингибиторы на путях доставки к клеткам ЖК. Представление о апоС-III как ингибиторе поглощения клетками ЖК не соответствуют принципам общей биологии [16].

Если субстратом постгепариновой (эндотелиальной) ЛПЛ + апоС-II являются пальмитиновые и олеиновые ТГ в ЛПОНП, то субстратом печеночной гидролазы + апоС-III являются линолевые и линоленовые ТГ в ЛПНП. Выявленное различие субстратов – ТГ в ЛПОНП и ТГ ЛПНП определило наличие и двух разных систем фермент + кофактор. Мы полагаем, что повышение содержания а плазме крови не только апоС-III, но и печеночной липазы, являются тестом того, что а) физико-химические свойства ТГ в ЛПНП стали не оптимальными для гидролиза; б) образование лигандных ЛПНП нарушено, биодоступность их для клеток снижена; в) уменьшено поглощение клетками ЛПНП путем апоВ-100-эндоцитоза и г) развивается внутриклеточный дефицит ПНЖК. Повышение содержания апоС-III – тест нарушенного липолиза в ЛПНП и поглощения их клетками.

*Пальмитиновые ЛПОНП, низкая биодоступность для клеток ЛПНП и ПНЖК; диагностическое значение ХС-ЛПНП.* Ключевым этапом биохимических, физико-химических превращений в крови пальмитиновых, олеиновых ЛПОНП становится поглощение инсулинзависимыми клетками при апоЕ/В-100-эндоцитозе. При физиологичном преобладании в крови олеиновых ЛПОНП над пальмитиновыми, постгепариновая ЛПЛ + апоС-II в секретированных гепатоцитах прелигандных ЛПОНП гидролизуют ТГ. Когда количество ассоциированных с апоВ-100 олеиновых ТГ станет оптимальным, молекула апоВ-100 быстро изменяет конформацию и на поверхности ПОНП формируется апоЕ/В-100 кооперативный лиганд [17]. Связывая лигандные ЛПНП одноименными рецепторами мембраны, клетки активно поглощают олеиновые и пальмитиновые ТГ с переносимыми НЖК + МЖК. В крови остается не более 10% секретированных гепатоцитами ЛПОНП – это линолевые + линоленовые ЛПОНП.

Если гепатоциты секретируют в кровь физиологичные, но потенциально неоптимальные пальмитиновые ЛПОНП, гидролиз в них пальмитиновых ТГ происходит с низкой скоростью [18]. И когда клетки из кровотока поглощают все лигандные олеиновые ЛПОНП; сформировать лиганд успела только часть пальмитиновых ЛПОНП. В силу этого после окончания физиологичной постпрандиальной ГЛП в крови остаются не только физиологичные линолевые и линоленовые ЛПОНП, но и часть пальмитиновых безлигандных ЛПОНП. Это ЛПОНП, которые содержат такие ТГ, как пальмитоил-пальмитоил-пальмитат и пальмитоил-олеил-пальмитат. Постгепариновая ЛПЛ гидролизует их с наиболее низкими константами скорости реакции. Поскольку гепатоциты физиологично секретируют пальмитиновых ЛПОНП много больше, чем линолевых + линоленовых ЛПОНП, по окончании постпрандиальной ГЛП в крови остаются не только физиологичные ЛПОНП, но и афизиологичные пальмитиновые ЛПОНП; содержание последних может быть больше суммы линолевых + линоленовых ЛПОНП.

При действии печеночной гидролазы +

апоС-III и продолжении липолиза пальмитиновые ЛПОНП одновременно с линолевыми и линоленовыми превращаются в пальмитиновые ЛПНП. Физиологично липолиз в линолевых и линоленовых ЛПНП активируют поли-ЭХС, которые при действии БППЭХ по градиенту концентрации переходят из ЛПВП. Однако перехода физиологичных поли-ЭХС одновременно в пальмитиновые + линолевые + линоленовые ЛПНП оказывается явно недостаточно для активации липолиза. Ингибирует липолиз и преобладание афизиологичных пальмитиновых ЛПНП, которые как субстрат не оптимальны для печеночной липазы + апоС-III. В этих условиях ни пальмитиновые, ни линолевые и линоленовые ТГ не могут сформировать и выставить на поверхность ЛПНП апоВ-100-лиганд. Клетки же не могут рецепторным эндцитозом поглотить безлигандные (прелигандные) ЛПНП, биодоступность для клеток ПНЖК в форме поли-ЭХС – практически нулевая.

Результатом становится высокий уровень ХС-ЛПНП; это количество спирта ХС, которым эквивалентно этерифицированы ПНЖК в форму поли-ЭХС, которые не в состоянии поглотить клетки. Чем выше ХС-ЛПНП, тем больше ПНЖК не могут поглотить клетки, тем более выражен в них дефицит ПНЖК. Действие печеночной липазы + апоС-III в крови продолжается и пальмитиновые прелигандные ЛПНП постепенно превращаются в самые малые, с высокой гидратированной плотностью, выражены атерогенные ЛПНП. Всю массу безлигандных ЛПНП, которые не могут быть рецепторно поглощены клетками, физиологично денатурируют нейтрофилы путем окисления активными формами кислорода; все их опсонизируют компоненты комплемента. Далее клетки моноцита эндотелия, реализуя биологическую реакцию эндцитоза, выводят все безлигандные ЛПНП в интиму артерий эластического типа, в физиологичный пул сбора и утилизации «биологического мусора» из локального, внутрисосудистого пула межклеточной среды. Повышение в плазме крови содержания апоС-III, мы полагаем, отражает увеличение в ЛПНП уровня пальмитиновых ЛПНП; концентрация апоС-III белка позитивно коррелирует с ХС-ЛПНП.

Повышение в плазме крови содержания апоС-III можно рассматривать и как тест снижения перехода поли-ЭХС из ЛПВП в линолевые и линоленовые ЛПОНП при действии БППЭХ. Это этап филогенетически раннего варианта переноса и активного поглощения клетками ПНЖК в неполярной форме поли-ЭХС; функционирует он у кроликов, морских свинок, приматов и человека. Чем больше поли-ЭХС переходят в небольшой пул линолевых и линоленовых ЛПОНП из ЛПВП при действии БППЭХ, тем активнее: а) становится гидролиз ТГ печеночной липазой + апо-III; б) быстрее формируются лигандные ЛПНП и в) быстрее их поглощают клетки путем апоВ-100-эндоцитоза со всеми ПНЖК.

Когда же поли-ЭХС из ЛПВП переходят в афизиологичный пул пальмитиновые + линолевые + линоленовые ЛПОНП, в котором доминируют пальмитиновые ЛПНП, пула поли-ЭХС оказывается явно недостаточно для активации гидролиза ТГ при действии печеночной липазы + апоС-III; по причине низкого гидролиза ТГ, все ЛПОНП превращаются в одноименные ЛПНП; лигандными они уже не станут. Биодоступность для клеток безлигандных ЛПНП нулевая; при этом возрастает ХС-ЛПНП и формируется дефицит в клетках ПНЖК и развивается атеросклероз. При этом безлигандные пальмитиновые,

линолевые и линоленовые ЛПНП оказываются в атероматозной массе в интима артерий со всеми ПНЖК, которые не смогли поглотить клетки.

*Причины низкой биодоступности ЛПНП, повышения ХС-ЛПНП и дефицита в клетках  $\omega$ -3 +  $\omega$ -6 ПНЖК.* Чтобы апоВ-100 принял активную конформацию и все пальмитиновые и олеиновые ЛПОНП стали лигандными, необходим оптимальный по скорости гидролиз ТГ в прелигандных ЛПОНП. Все факторы, которые ингибируют гидролиз ТГ в ЛПОНП, замедляют формирование активной конформации апоВ-100, блокируют образование лиганда в пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП – снижают активное поглощение их инсулинозависимыми клетками, являясь причиной ГТГ без ХМ.

Секреция гепатоцитами преимущественно пальмитиновых ЛПОНП при высоком содержании в пище (экзогенной) пальмитиновой НЖК (более 15% всех ЖК) и пальмитиновых ТГ. В пальмитиновых ТГ, во второй позиции (sn-2) трехатомного глицерина, со вторичной спиртовой группой этерифицирована С 16 : 0 пальмитиновая НЖК [19]. Гепатоциты не могут понизить содержание экзогенной пальмитиновой НЖК. Пальмитиновую НЖК не связывают рецепторы активации пролиферации пероксисом (РАПП) на мембране ядра гепатоцитов и не понижают избыточное ее количество при активации  $\beta$ -окисления НЖК в пероксисомах [20].

Секреция гепатоцитами преимущественно пальмитиновых ЛПОНП из-за усиления эндогенного синтеза клетками пальмитиновой НЖК *in situ de novo* из глюкозы. Напомним, что инсулин активирует поглощение инсулинозависимыми клетками глюкозы через ГЛЮТ4 главным образом для активации липогенеза, для синтеза ЖК. С ранних ступеней филогенеза все клетки из ацетил-КоА, в том числе и из глюкозы, синтезируют в цикле Линнена только пальмитиновую НЖК.

И только при становлении биологической функции локомоции, системы инсулина, гормон, мы полагаем, инициировал замену потенциально малоэффективного пальмитинового варианта метаболизма ЖК и синтеза АТФ на олеиновый, высокопроизводительный вариант обеспечения инсулинозависимых клеток энергией в форме АТФ. Для этого инсулин экспрессирует синтез гепатоцитами двух ферментов: а) пальмитоил-КоА-элонгазу и стеарил-КоА-десатуразу. Инсулинозависимые ферменты активируют биологические реакции: а) С16 : 0 пальмитиновая НЖК → (пальмитоилэлонгаза) → С18 : 0 стеариновая НЖК; б) далее С18 : 0 стеариновая НЖК → (стеарил-КоА-десатураза) →  $\omega$ -9 С18 : 1 олеиновая МЖК [21]. Можно сказать: инсулин активирует поглощение клетками глюкозы с целью реализации биологической функции локомоции – превращения всей экзогенной глюкозы в биохимически высокоэффективную олеиновую МЖК и депонирования ее в инсулинозависимых адипоцитах в олеиновых ТГ.

В условиях резистентности к инсулину, инсулинорезистентности (ИР), из глюкозы инсулинозависимые гепатоциты синтезируют только пальмитиновую НЖК, образуют пальмитиновые ТГ и секретируют пальмитиновые ЛПОНП. При этом *in vivo* функционирует малоэффективный, пальмитиновый вариант метаболизма ЖК и наработки АТФ [22].

Высокое содержание в животной пище пальмитиновой НЖК всегда сопровождается повышенным уровнем полярного спирта ХС. Поскольку ни одной из клеток *in vivo* экзогенный ХС не нужен, в энтероцитах нет систем

всасывания ХС; однако спирт все-таки попадает в энтероциты путем пассивной диффузии через плазматическую мембрану по градиенту концентрации. Полярный ХС гепатоциты поглощают в составе секретируемых энтероцитами апоА-I ЛПВП. Чем больше ХС поглощают гепатоциты в ЛПВП, тем активнее клетки от него «избавляются»; они включают его в монослой полярных липидов на поверхности неполярных ТГ в структуре ЛПОНП. Чем выше отношение ХС/ФЛ в монослое полярных липидов ЛПОНП, тем в большей мере монослой разобщает (отделяет) гидрофобный субстрат липолиза (ТГ в ЛПОНП) от ЛПЛ + апоС-II, которые функционируют в гидрофильной плазме крови. Синтез этого пула спирта ХС в гепатоцитах и ингибируют статины, активируя гидролиз ТГ в пальмитиновых, олеиновых, линолевых и линоленовых ЛПОНП. Это и объясняет способность статинов понижать концентрацию ТГ в плазме крови [23].

ГЛП фенотипа II б именуют семейной комбинированной ГЛП; она включает дефекты нарушения первичной структуры и активности постгепариновой ЛПЛ. Если нарушения первичной структуры постгепариновой ЛПЛ + кофактор апоС-II при ГЛП фенотипа I являются столь «серьезными», что липаза не гидролизует в ЛПОНП физиологичные, олеиновые ТГ, то при ГЛП фенотипа (типа) II б происходит сниженной активности постгепариновой ЛПЛ при гидролизе физиологичных, но не оптимальных, пальмитиновых ТГ в ЛПОНП [24]. Сколь часто снижение активности ЛПЛ является причиной семейной комбинированной ГЛП фенотипа II б?

Нарушение гидролиза ТГ в ЛПНП может инициировать и низкое содержание в пище  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3 ПНЖК [25]. Они в малом количестве переходят из ЛПВП в линолевые и линоленовые ЛПОНП при действии БППЖК, формируя низкую скорость гидролиза одноименных ТГ. Нарушение фенотипа не столь раннего в филогенезе апоЕ, что подробно рассмотрено нами выше, является причиной выраженной ГТГ + ХМ; происходит это при афизиологичных фенотипах E2/E2 и E4/E4 [26]. Пуляционные и генетические протоколы показывают, что эти фенотипы выявляются чаще, чем происходит выявление ГЛП фенотипов III и V в клинике. Видимо, при продолжении нарушения биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии мы имеем возможность иметь большее количество пациентов с этими фенотипами (типами) ГЛП [27].

Фактором снижения липолиза ТГ в ЛПОНП у отдельных пациентов могут стать и невыразительные нарушения первичной структуры апоВ-100, в липидсвязывающих доменах, которые более эффективно связывают пальмитиновые и олеиновые ТГ с формированием одноименных ЛПОНП. При более высокой аффинности физико-химического связывания апоВ-100 ↔ ТГ реакции гидролиза может оказалась сниженной [28].

Понизить гидролиз ТГ в ЛПНП может и низкая активность БППЭХ при формировании ими тройственного ассоциата ЛПВП + БППЭХ + ЛПОНП, что даже при возрастании ХС-ЛПВП будет инициировать низкую биодоступность для клеток ЛПНП и внутриклеточный дефицит ПНЖК с развитием атеросклероза и атероматоза.

Уменьшить липолиз ТГ в линолевых и линоленовых ЛПОНП и ЛПНП может и повышенное содержание пальмитиновой НЖК, этерифицированной в sn-1 и sn-3 спирта глицерина, а также низкая активность печеночной липазы и ее кофактора апоС-III.

В последнее время внимание исследователей привлекает и роль в патогенезе ГЛП мутаций нового апо - апоА-V; это гикозил-фосфатидилинозитол «заякоренный» протеин рафтов (выраженно гидрофобных плотов) плазматической мембраны клеток, который способен ассоциироваться с ЛПВП [29]. При повышении концентрации апоА-V в плазме крови он способен активировать посперариновую ЛПЛ [30]. Формирование мутантных форм апоА-V связывают с формированием ГТГ и развитием панкреатита в случаях выраженной ГЛП [31].

Нормализовать параметры метаболизма ЛПОНП в крови, активировать формирование лигандных ЛПОНП и апоЕ/В-100-эндоцитоз их клетками можно, если: а) уменьшить количество ЛПОНП, которые секретируют в кровотоке гепатоциты, уменьшить индукцию субстратом (количество пищи); б) уменьшить в ЛПОНП содержание пальмитиновых ЛПОНП и увеличить количество олеиновых за счет изменения качественного состава пищи; в) повысить количество линолевых и линоленовых ЛПОНП и заменить ими части пальмитиновых ЛПОНП [32] и г) увеличить содержание экзогенных  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3 ПНЖК за счет увеличения индукции субстратом.

Следовательно, при семейной комбинированной ГЛП фенотипа II б даже самое добросовестное соблюдение пациентом диеты может не привести к нормализации ГЛП и снижению ХС-ЛПНП [33]. В этом случае потребуется проведение гиполлипидемической терапии статинами и фибратами; применение блокаторов активности БППЭХ - афизиологично. И действие всех гиполлипидемических препаратов будет направлено на нормализацию липолиза ТГ в инсулинозависимых ЛПОНП. Действие обоих гиполлипидемических препаратов будет существенно более эффективным при снижении содержания в пище пальмитиновой НЖК и увеличении количества  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3 ПНЖК.

Статины (ингибиторы активность  $\beta$ -гидрокси- $\beta$ -метилглутарол-КоА-редуктазы – ключевой фермент синтеза спирта ХС) активируют липолиз пальмитиновых, олеиновых ТГ в одноименных ЛПОНП путем ингибирования синтеза пула спирта ХС в ЛПОНП. Чем выше в монослое полярных липидов отношение ХС/ФЛ, тем более ингибирован гидролиз ТГ. Происходит это в результате физико-химического разобщения липаза + апоС-II и субстрат липолиза – неполярные ТГ в ЛПОНП. Статины: а) ингибируют синтез ХС в локальном пуле ЛПОНП; б) активируют гидролиз пальмитиновых и олеиновых ТГ в одноименных ЛПОНП; в) усиливают формирование лигандных ЛПОНП и поглощение их клетками путем апоЕ/В-100-эндоцитоза [34]. Физиологично более 90% ЛПОНП в крови не превращаются в ЛПНП; клетки поглощают их как ЛПОНП. Это и есть причина снижения действия статинов в плазме крови ТГ, ЛПОНП, ЛПНП и ХС-ЛПНП.

Фибраты – афизиологичные, синтетические, циклические, более гидрофобные, чем натуральные, короткоцепочечные ЖК в форме эфиров с этиловым и изопропиловым спиртами. При гидролизе в тонком кишечнике эфиров фибровой кислоты энтероциты всасывают полярные синтетические ЖК и, более вероятно, этерифицируют их, как и все афизиологичные ЖК, в пальмитиновые и олеиновые ТГ и секретируют в лимфо- и кровотоке. Далее ХМ с фибратами поглощают гепатоциты путем апоЕ/В-48 рецепторного эндоцитоза. После гидролиза ТГ и освобождения фибратов из ТГ их связывают рецепторы активации пролиферации пероксисом

(РАПП) на мембране ядра. Далее для утилизации фибратов, как и иных афизиологичных ЖК, взаимодействие фибраты + РАПП активируют синтез в пероксисомах комплекс оксидаз ( $\beta$ -оксидаза,  $\alpha$ - и  $\omega$ -оксидаза). Комплекс фибраты (лиганд) + РАПП (рецептор) вызывают выраженную активацию пероксисом вплоть до их гипертрофии; при этом пероксисомы усиливают окисление не только самих фибратов, но и части экзогенной пальмитиновой НЖК и пальмитиновых ЛПОНП. Это активирует гидролиз ТГ, формирование лигандных ЛПОНП и поглощение клетками путем апоВ-100 рецепторного эндоцитоза [35]. При этом фибраты понижают содержание в плазме крови ТГ, спирта ХС, ЛПОНП, ЛПНП и ХС-ЛПНП.

Статины и фибраты оказывают гипогликемическое действие по единому алгоритму. И статины и фибраты: а) активируют гидролиз ТГ в пальмитиновых, олеиновых, линолевых и линоленовых ЛПОНП; б) усиливают поглощение зависимыми от инсулина клетками пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП путем апоЕ/В-100-эндоцитоза [36]; в) нормализуют биохимические превращения ЛПНП, не допуская формирования пальмитиновых ЛПНП и г) нормализуют биодоступность для клеток ПНЖК в составе линолевых и линоленовых ЛПНП при апоВ-100 рецепторном эндоцитозе [37]. Только статины для этого ингибируют синтез локального пула спирта ХС в гепатоцитах, полярного пула ХС одновременно в пальмитиновых, олеиновых, линолевых и линоленовых ЛПОНП. Фибраты же понижают содержание в гепатоцитах экзогенной пальмитиновой НЖК, пальмитиновых ТГ и одноименных ЛПОНП, предотвращая формирование пальмитиновых ЛПНП.

Используя этот же алгоритм, гиполлипидемическое действие проявляют и ПНЖК, особенно  $\omega$ -3 ПНЖК рыбьего жира [38, 39]. Будучи активными экзогенными лигандами для РАПП на мембране ядра,  $\omega$ -3 ПНЖК выражено активируют функцию пероксисом, окисление ими части экзогенной пальмитиновой НЖК до момента формирования и секреции в кровотоке ЛПОНП.  $\omega$ -3 ПНЖК понижают секрецию в кровотоке пальмитиновых ЛПОНП, нормализуют поглощение их всеми инсулинозависимыми клетками, а далее и поглощение всеми клетками ПНЖК в ЛПНП путем апоВ-100 рецепторного эндоцитоза.

В ЛПОНП, но в линолевых и линоленовых, оказывает физико-химическое действие и гиполлипидемический препарат пробукол [40]. Будучи ксенобиотиком, также как статины и фибраты, пробукол не вступает *in vivo* ни в какие биохимические реакции. Синтезированный изначально как акцептор (захватчик) активных форм кислорода (АФК) [41], пробукол проявляет низкую активность в инактивации АФК в силу выраженных особенностей строения его молекулы. В то же время физико-химические параметры пробукола во многом оказались схожими с параметрами поли-ЭХС,  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 ПНЖК, этерифицированными спиртом ХС. В организме пробукол проявляет физико-химическое действие, сходное с поли-ЭХС. Энтероциты всасывали пробукол и включали его в состав апоА-I + апоА-II ЛПВП. Когда в крови в рамках тройственного ассоциата ЛПВП + БППЭХ + ЛПОНП поли-ЭХС из ЛПВП переходили в состав линолевых и линоленовых ЛПОНП, вместе с ними переходит и пробукол. Обладая большей гидрофобностью, чем ТГ, пробукол «вытесняет» линолевые и линоленовые ТГ из связи с доменами апоВ-100, активирует их гидролиз, превращение ЛПОНП в ЛПНП, формирование лиганд-

ных ЛПНП, которые клетки поглощают путем апоВ-100-эндоцитоза [42]. Таким образом, пробукол активирует поглощение клетками ПНЖК в форме поли-ЭХС в составе лигандных линолевых и линоленовых ЛПНП путем апоВ-100-эндоцитоза.

Трудно предположить, что ксенобиотики статины, фибраты и пробукол, чуждые для животного организма вещества с разной структурой молекулы могут проявлять *in vivo* биологическое, плейотропное действие. Физиологично *in vivo* его проявляют только филогенетически ранние гуморальные медиаторы эйкозаноиды – простагландины, простагландины, тромбоксаны, лейкотриены и резольвины [43]. Все они являются производными от  $\omega$ -6 С20 : 4 арахидоновой,  $\omega$ -3 С20 : 5 эйкозапентаеновой и С22 : 6 докозагексаеновой ПНЖК [44]. Более реально полагать, что, действуя по единому алгоритму, все гиполлипидемические препараты в итоге нормализуют поглощение клетками ПНЖК в форме поли-ЭХС в линолевых и линоленовых ЛПНП путем апоВ-100-эндоцитоза [45].

Многочисленные клинические наблюдения позитивного действия ПНЖК при атеросклерозе и ишемической болезни сердца подтверждают высказанное нами 15 лет назад мнение, что атеросклероз – это синдром дефицита в клетках эссенциальных ПНЖК [46, 47]. Основная причина развития – не алиментарный дефицит в пище полиеновых жирных кислот, хотя и это имеет место, а формирование *in vivo* низкой биодоступности для клеток ПНЖК в составе ЛПНП из-за афизиологично высокого содержания в пище насыщенных и трансформ МЖК [48]. В настоящее время в клинике ПНЖК используют не только в форме этиловых эфиров, как Омакор, но и в форме свободных ПНЖК [49, 50]. Сколь высок ХС-ЛПНП, столь же велико содержание в плазме крови ПНЖК, которые при низкой биодоступности не могут активно поглотить клетки. Поэтому основу первичной профилактики атеросклероза в первую очередь составляет уменьшение в пище содержания НЖК и трансформ МЖК, в первую очередь физиологичной С16 : 0 пальмитиновой насыщенной ЖК.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5-7, 10-12, 15-16, 18-19, 21-22, 24-25, 28-32, 34-37, 39-50 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. *Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез медицинских пандемий. Артериальная гипертония.* М.: ИНФРА-М; 2014.
2. Титов В.Н., Востров И.А., Ширяева Ю.К., Каба С.И. Становление в филогенезе липопротеинов низкой, очень низкой плотности и инсулина. Липотоксичность жирных кислот и липидов. Позиционные изомеры триглицеридов. *Успехи современной биологии.* 2012; 132(5): 506 - 26.
3. Титов В.Н. *Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. Сахарный диабет.* М.: ИНФРА-М; 2014.
4. Титов В.Н. Статины, холестерин, жирные кислоты и сахарный диабет. Научный диалог. *Естественнонаучная, экология, науки о земле.* 2013; 3(15): 148 – 83.
5. Рожкова Т.А., Малышев П.П., Титов В.Н. и др. Оценка комплекса генетически зависимых показателей: аполипопротеинов А1, В, СIII и Е и апо(а) у пациентов с гипертриглицеридемией в клинической амбулаторной практике. *Атеросклероз и дислипидемии.* 2013; 2(11): 40 – 5.
6. Рожкова Т.А., Амелюшкина В.А., Яровая Е.Б. и др. Клинико-

7. лабораторное выявление фенотипических особенностей у пациентов с высокой гипертриглицеридемией. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2011; 5: 10 - 6.
8. Зуева И.Б., Улитина А.С., Гораб Д.Н. и др. Полиморфизм гена апоЕ у пациентов с метаболическим синдромом и когнитивными расстройствами. *Артериальная гипертензия.* 2012; 18(5): 421 - 8.
9. Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Рожкова Т.А. Конформация апоВ-100 в филогенетически и функционально разных липопротеинах низкой и очень низкой плотности. Алгоритм формирования фенотипов гиперлипидемии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2014; 1: 27 38.
10. Рожкова Т.А., Титов В.Н., Амелюшкина В.А. и др. Диагностика умеренной и высокой гипертриглицеридемии у пациентов в поликлинической практике: первичные и вторичные нарушения липидного обмена. *Терапевтический архив.* 2010; 4: 10 - 7.
11. Коткина Т.И., Титов В.Н. Позиционные изомеры триглицеридов в маслах, жирах и апоВ-100-липопротеинах. Пальмитиновый и олеиновый варианты метаболизма жирных кислот – субстратов для наработки энергии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2014; 1: 22 - 43.
12. Павленко М.А., Байрамукова А.А., Алибаева Н.Т. и др. Роль полиморфизма гена аполипопротеина Е в развитии атеросклероза (Обзор). *Вестник КРСУ.* 2007; 7(9): 32 - 5.
13. Рожкова Т.А., Кухарчук В.В., Титов В.Н. и др. Лечение пациентов с гипертриглицеридемией. *Терапевтический архив.* 2009; 9: 29 - 33.
14. Титов В.Н. Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов, гиполлипидемическая терапия и профилактика атеросклероза. *Клинико-лабораторный консилум.* 2014; 2(49): 4 - 15.
15. Суркова Е.А., Дупляков Д.В. Практическая ценность омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в профилактике внезапной сердечной смерти. *Кардиология.* 2013; 6: 91 - 6.

## REFERENCES

1. Titov V.N. *Phylogenetic theory of general pathology. Pathogenesis of health pandemics. Arterial hypertension.* Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
2. Titov V.N. Phylogenetically theory of general pathology. Nutritive disturbance is the basis of metabolic syndrome pathogenesis overeating syndrome. Leptin and adiponectin role. *Eur. J. Med.* 2013; 1(1): 48 - 60.
3. Titov V.N., Vostrov I.A., Shiryayeva Yu.K., Kaba S.I. Becoming phylogeny lipoprotein, very low density and insulin. Lipotoxicity fatty acids and lipids. Positional isomers of triglycerides. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2012; 132(5): 506 - 26. (in Russian)
4. Titov V.N. *Phylogenetic theory of general pathology. The pathogenesis of metabolic pandemics. Diabetes.* Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
5. Kee P., Caiazza D., Rye K. et al. Effect of inhibiting cholesteryl ester transfer protein on the kinetics of high-density lipoprotein cholesteryl ester transport in plasma: in vivo studies in rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006; 26: 884 - 90.
6. Barter P.J., Rye K.A. Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk. *J. Lipid. Res.* 2012; 53(9): 1755 – 66.
7. Kim E., Campbell S., Schueller O. et al. A small-molecule inhibitor of enterocytic microsomal triglyceride transfer protein, SLx-4090: biochemical, pharmacodynamic, pharmacokinetic, and safety profile. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2013; 337(3): 775 - 85.
8. Titov V.N. Statins, cholesterol, fatty acids and diabetes. *Nauchnyy dialog/ Estestvoznание, ekologiya, nauki o zemle.* 2013; 3(15): 148 - 83. (in Russian)
9. Rozhkova T.A., Malyshev P.P., Titov V.N. et al. Evaluation of complex genetically dependent indicators: apolipoproteins A1, B, CIII, and E, and apo (a) in patients with hypertriglyceridemia in clinical outpatient practice. *Atherosclerоз i dislipidemii.* 2013; 2(11): 40 - 5. (in Russian)
10. Gotoda T., Shirai K, Ohta T. et al. Diagnosis and management of type I and type V hyperlipoproteinemia. *J. Atheroscler. Thromb.* 2011; 19(1): 1 - 12.
11. Chen T.Z., Xie S., Jin R., Huang Z.M. A novel lipoprotein lipase

- gene missense mutation in Chinese patients with severe hypertriglyceridemia and pancreatitis. *Lipids. Health. Dis.* 2014; 13: 52 - 5.
12. Connelly P.W. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism. *Clin. Chima. Acta.* 1999; 286: 243 - 55.
  13. Rozhkova T.A., Ameluschkina V.A., Yarovaya E.B. et al. Clinical and laboratory identification of phenotypic features in patients with high hypertriglyceridemia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2011; 5: 10 - 6. (in Russian)
  14. Zueva I.B., Ulitina A.C., Gorab D.N. et al. ApoE gene polymorphism in patients with metabolic syndrome and cognitive disorders. *Arterialnaya gipertenziya.* 2012; 18(5): 421 - 8. (in Russian)
  15. Miyashita K., Kobayashi J., Imamura S. et al. A new enzyme-linked immunosorbent assay system for human hepatic triglyceride lipase. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 424: 201 - 6.
  16. Zheng C. Updates on apolipoprotein CIII: fulfilling promise as a therapeutic target for hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 2014; 25(1): 35 - 9.
  17. Titov V.N., Ameluschkina V.A., Rozhkova T.A. The conformation of apoB-100 in phylogenetically and functionally different lipoprotein and very low density. The algorithm for generating the phenotypes of hyperlipoproteinemia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2014; 1: 27 - 38. (in Russian)
  18. Bracco U. Am. Effect of triglyceride structure on fat absorption. *J. Clin. Nutr.* 1994; 60: 1002S - 1009S.
  19. Nelson C.M., Innis S.M. Plasma lipoprotein fatty acids are altered by the positional distribution of fatty acids in infant formula triacylglycerols and human milk. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 70: 62 - 9.
  20. Rogkova T.A., Titov V.N., Ameluschkina V.A. et al. Diagnosis of moderate and high hypertriglyceridemia in patients outpatient practice: primary and secondary lipid metabolism. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2010; 4: 10 - 7. (in Russian)
  21. Stamatikos A.D., Paton C.M. Role of stearoyl-CoA desaturase-1 in skeletal muscle function and metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2013; 305: E767 - E775.
  22. Pang J., Chan D.C., Watts G.F. Origin and therapy for hypertriglyceridaemia in type 2 diabetes. *World J. Diabetes.* 2014; 5(2): 165 - 75.
  23. Kotkina T.I., Titov V.N. Positional isomers triglyceride oils, fats and apoB-100-lipoproteins. Palmitic and oleic variants of fatty acid metabolism - the substrates for producing energy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2014; 1: 22 - 43. (in Russian)
  24. Salvado L., Col T., Gomez-Foix A.M. et al. Oleate prevents saturated-fatty-acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells through an AMPK-dependent mechanism. *Diabetologia.* 2013; 56(6): 1372 - 82.
  25. Serhan C.N. Novel omega - 3-derived local mediators in anti-inflammation and resolution. *Pharmacol. Therap.* 2005; 105: 7 - 21.
  26. Pavlenko M.A., Bayramukova A.A., Alibaeva N.T. et al. Role of apolipoprotein E polymorphism in the development of atherosclerosis (Review). *Vestnik KRSU.* 2007; 7(9): 32 - 5. (in Russian)
  27. Rozhkova T.A., Kuharchuk V.V., Titov V.N. et al. Treatment of patients with hypertriglyceridemia. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2009; 9: 29 - 33. (in Russian)
  28. Ballantyne C.M., Raichlen J.S., Cain V.A. Statin therapy alters the relationship between apolipoprotein B and low-density lipoprotein cholesterol and non-high-density lipoprotein cholesterol targets in high-risk patients: the MERCURY II (Measuring Effective Reductions in Cholesterol Using Rosuvastatin) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 52(8): 626 - 32.
  29. Mendoza-Barbera E., Julve J., Nilsson S.K. et al. Structural and functional analysis of APOA5 mutations identified in patients with severe hypertriglyceridemia. *J. Lipid. Res.* 2012; 54(3): 649 - 61.
  30. Huang X., Zhao S., Bai Z. et al. Atorvastatin and fenofibrate increase apolipoprotein AV and decrease triglycerides by up-regulating peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Br. J. Pharmacol.* 2009; 158: 706 - 12.
  31. Coca-Prieto I., Valdivielso P., Olivecrona G. et al. Lipoprotein lipase activity and mass, apolipoprotein C-II mass and polymorphisms of apolipoproteins E and A5 in subjects with prior acute hypertriglyceridemic pancreatitis. *BMC Gastroenterol.* 2009; 9: 46 - 51.
  32. Sato M., Shibata K., Nomura R. et al. Linoleic acid-rich fats reduce atherosclerosis development beyond its oxidative and inflammatory stress-increasing effect in apolipoprotein E-deficient mice in comparison with saturated fatty acid-rich fats. *Br. J. Nutr.* 2005; 94(6): 896 - 901.
  33. Titov V.N. The clinical biochemistry of fatty acids, lipids and lipoproteins, lipid-lowering therapy and prevention of arteriosclerosis. *Kliniko-laboratorniy konsilium.* 2014; 2(49): 4 - 15. (in Russian)
  34. Susekov A.V., Basyrova E.R., Gorniakova N.B. et al. Inhibitors of HMG-Co-A reductase (statins) in the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis at the turn of decades *Kardiologia.* 2010; 50(12): 84 - 91. (in Russian)
  35. Susekov A.V., Khokhlova N.V. Perspectives of the use of fenofibrate in patients with type 2 diabetes mellitus: what is new after the ACCORD Study? *Kardiologia.* 2011; 51(9): 68 - 74. (in Russian)
  36. Rosenblit P.D. Do persons with diabetes benefit from combination statin and fibrate therapy? *Curr. Cardiol. Rep.* 2012; 14(1): 112 - 24.
  37. Smith W.G., Wang J., Dang A.Q. et al. Gemfibrozil lowers plasma lipids and increases polyunsaturated fatty acid content and oxidative susceptibility of lipoproteins in hypertriglyceridemia. *Clin. Chim. Acta.* 2002; 322(1-2): 77 - 84.
  38. Surkova E.A., Duplyakov D.V. The practical value of omega-3 polyunsaturated fatty acid in the prevention of sudden cardiac death. *Kardiologiya.* 2013; 6: 91 - 96. (in Russian)
  39. Flachs P., Rossmeisl M., Kopecky J. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol. Res.* 2014; 63(1): S93 - S118.
  40. Zhong J.K., Guo Z.G., Li C. et al. Probuocol alleviates atherosclerosis and improves high density lipoprotein function. *Lipids. Health. Dis.* 2011; 10: 210 - 21.
  41. Noguer M., Cerezo A.B., Moya M.L., Troncoso A.M. Synergism effect between phenolic metabolites and endogenous antioxidants in terms of antioxidant activity. *Adv. Chem. Engin. Sci.* 2014; 4: 258 - 65.
  42. Meng X.P., Wang S.X., Zhang J.C. et al. Effects of probuocol, aspirin and atorvastatin combination therapy upon atherosclerosis Zhonghua. *Yi. Xue. Zhi.* 2009; 89(28): 1986 - 8.
  43. Maki K.C., Orloff D.G., Nicholls S.J. et al. A highly bioavailable omega-3 free fatty acid formulation improves the cardiovascular risk profile in high-risk, statin-treated patients with residual hypertriglyceridemia (the ESPRIT trial). *Clin. Ther.* 2013; 35(9): 1400 - 11.
  44. Oh P.C., Koh K.K., Sakuma I. et al. Omega-3 fatty acid therapy dose-dependently and significantly decreased triglycerides and improved flow-mediated dilation, however, did not significantly improve insulin sensitivity in patients with hypertriglyceridemia. *Int. J. Cardiol.* 2014; 176(3): 696 - 702.
  45. Vecka M., Dusejovska M., Stankova B. et al. N-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of atherogenic dyslipidemia. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2012; 33(2): 87 - 92.
  46. Galli C., Maggi F.M., Rise P., Sirtori C.R. Bioequivalence of two omega-3 fatty acid ethyl ester formulations: a case of clinical pharmacology of dietary supplements. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 74(1): 60 - 5.
  47. Aiman U., Najmi A., Khan R.A. Statin induced diabetes and its clinical implications. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2014; 5(3): 181 - 5.
  48. Davidson M.H., Johnson J., Rooney M.W. et al. A novel omega-3 free fatty acid formulation has dramatically improved bioavailability during a low-fat diet compared with omega-3-acid ethyl esters: the ECLIPSE (Epanova®) compared to Lovaza®) in a pharmacokinetic single-dose evaluation) study. *J. Clin. Lipidol.* 2012; 6(6): 573 - 84.
  49. Blair H.A., Dhillon S. Omega-3 carboxylic acids (Epanova): a review of its use in patients with severe hypertriglyceridemia. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 2014; 14(5): 393 - 400.
  50. Kastelein J.J., Maki K.C., Susekov A. et al. Omega-3 free fatty acids for the treatment of severe hypertriglyceridemia: the epanova for lowering very high triglyceridEs (EVOLVE) trial. *J. Clin. Lipidol.* 2014; 8(1): 94 - 106.

© ПОТЕРЯЕВА О.Н., УСЫНИН И.Ф., 2019

Потеряева О.Н., Усынин И.Ф.

## ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФУНКЦИИ ПРОИНСУЛИНА

НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины, 630117, Новосибирск, Россия

*Проинсулин – один из показателей, отображающих функциональную активность поджелудочной железы. При инсулин-независимом диабете соотношение проинсулин/инсулин увеличивается. В обзоре рассмотрены причины возникновения гиперпроинсулинемии и диагностическое значение проинсулина у больных сахарным диабетом 1 и 2 типов. Обсуждается роль проинсулина в регуляции метаболических путей и сохранении функциональной активности клеток в физиологических условиях, во время старения и при патологических процессах. Исследования в этих направлениях обосновывают включение прогормона инсулина в суперсемейство сигнальных факторов. Рассмотрены нейропротекторная активность проинсулина и его потенциал в качестве терапевтического инструмента при нейродегенеративных заболеваниях и дистрофии сетчатки.*

**Ключевые слова:** проинсулин; сахарный диабет; регуляторные функции; обзор.

**Для цитирования:** Потеряева О.Н., Усынин И.Ф. Диагностическое значение и регуляторные функции проинсулина. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (7): 397-404. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-397-404>

Poteryaeva O.N., Usynin I.F.

### DIAGNOSTICS VALUE AND REGULATORY FUNCTIONS OF PROINSULIN

Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Fundamental and Translation Medicine, 2 Timakova str., Novosibirsk, 630117, Russia.

*Proinsulin is one of the indicators reflecting the functional activity of the pancreas. In insulin-independent diabetes mellitus the ratio proinsulin / insulin is increased. The review examined the causes of hyperproinsulinemia and the diagnostic value of proinsulin in patients with diabetes mellitus type 1 and 2. The role of proinsulin in the regulation of metabolic pathways and the preservation of the functional activity of cells under physiological conditions, during aging and during pathological processes is discussed. Studies in these areas justify the inclusion of proinsulin in the superfamily of signaling factors. The neuroprotective activity of proinsulin and its potential as a therapeutic tool for neurodegenerative diseases and retinal dystrophy are considered.*

**Key words:** proinsulin; diabetes mellitus; regulatory functions; overview.

**For citation:** Poteryaeva O.N., Usynin I.F. Diagnostics value and regulatory functions of proinsulin. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (7): 397-404 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-397-404>

**For correspondence:** Poteryaeva O.N., Dr. Sci. Med., lead researcher of the laboratory of intercellular interactions; e-mail: [olga\\_Poteryaeva@mail.ru](mailto:olga_Poteryaeva@mail.ru)

#### Information about authors :

Poteryaeva O.N., <http://orcid.org/0000-0003-1068-2431>

Usynin I.F., <https://orcid.org/0000-0003-1752-9034>

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

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

Received 08.05.2019  
Accepted 15.06.2019

## Синтез и секреция проинсулина

Проинсулин (проИ) был впервые идентифицирован в качестве основного продукта трансляции гена инсулина в лаборатории Дональда Штейнера в 1967 г. Эксперименты, проведенные на  $\beta$ -клетках аденомы поджелудочной железы, привели к открытию белка с молекулярной массой 10,8 kDa. При расщеплении белка трипсином был получен инсулиноподобный материал, который стали рассматривать как белок-предшественник инсулина с очень низкой метаболической активностью, названный проИ [1]. В начале 90-х годов прошлого столетия были обнаружены ферменты, ответственные за эндопротеолитическое расщепление проИ на инсулин и С-пептид,

белок PC2, состоящий из 638 аминокислотных остатков (АКО) и белок PC3 (PC1), состоящий из 753 АКО [2]. Оба белка являются кальций-зависимыми сериновыми эндопептидазами, относящимися к классу субтилизинов. После селективного расщепления С-пептида от А-цепи по Lys-Arg или от В-цепи по Arg-Arg образуются продукты с С-концевыми основными остатками, которые затем удаляются карбоксипептидазой E [1, 2].

В настоящее время все этапы синтеза проИ, С-пептида и инсулина окончательно установлены [3]. Инсулин вырабатывается  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, главным стимулом к синтезу и выделению инсулина служит повышение концентрации глюкозы в крови. У человека ген, кодирующий первичную структуру предшественника инсулина, локализован в коротком плече 11 хромосомы. На рибосомах шероховатой эндоплазматической сети синтезируется пептид-предшественник – препроинсулин (11,5 kDa), который накапливается на цито-

**Для корреспонденции:** Потеряева Ольга Николаевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. механизмов межклеточных взаимодействий; e-mail: [olga\\_Poteryaeva@mail.ru](mailto:olga_Poteryaeva@mail.ru)

зольной стороне эндоплазматического ретикулума (ЭР). Препроинсулин представляет собой полипептидную цепь, построенную из 110 АКО, которая включает в себя последовательно расположенные L-пептид, В-пептид, С-пептид и А-пептид. После синтеза от препроинсулина отщепляется сигнальный L-пептид, состоящий из 24 АКО, вследствие чего образуется молекула проИ. Этот процесс происходит в течение 1-2 мин, он необходим для прохождения синтезируемой молекулы через гидрофобную липидную мембрану ЭР. Полипептидная цепь проИ включает 86 АКО, её молекулярная масса составляет 9,39 kDa [4]. В молекуле проИ пептидные цепи А и В соединены линейным пептидом, так называемым С-пептидом, состоящим из 33 АКО и расположенным между карбоксильным концом В-цепи и аминокислотным концом А-цепи. С-пептид способствует приближению обеих линейных цепей для облегчения образования бисульфидных связей. Правильно уложенные пептиды проИ самообъединяются, формируя нековалентно связанные гомодимеры, выходят из ЭР, передвигаясь к комплексу Гольджи, который лимитирует скорость этапа транспортировки. В цистернах комплекса происходит созревание инсулина. Время этого этапа - 2-4 часа. Превращение проИ в инсулин происходит в малых (ранних) секреторных гранулах. В процессе созревания из молекулы проИ протеолитическим путём вырезается С-пептид. Молекула проИ разделяется на инсулин и инертный пептидный остаток, на что уходит 20-40 минут [5 - 7].

Проинсулин - это форма хранения инсулина в клетках поджелудочной железы, где он заключен в секреторные гранулы, в которых проИ формирует гексамеры. Здесь же происходит протеолитическое отщепление С-пептида и хранится зрелый инсулин. Под действием стимулирующих факторов из гранул путем экзоцитоза в кровотоки освобождается инсулин. При этом не требуется времени на образование гормона [8,9]. Примерно 80-90% общего циркулирующего инсулина происходит из зрелого, биологически активного инсулина. В норме содержание проИ в плазме крови не превышает 3-5%. При патологии эта цифра может возрастать до 50%. Аффинность проИ к инсулиновому рецептору не превышает 5% [3], а его сахароснижающая способность в 12-14 раз ниже, чем у инсулина [10]. Кроме того, в крови обнаруживают небольшой процент продуктов неполного расщепления проИ - пептидов (31,32)-проинсулин и (64,65)-проинсулин [11].

### Диагностическое значение проинсулина у больных сахарным диабетом

У лиц, не имеющих патологии со стороны углеводного обмена, иммунореактивность проИ и проИ-связанных пептидов составляет 2-4 % от реактивности секретированного инсулина. При сахарном диабете (СД) 2 типа соотношение проинсулин-подобных пептидов к инсулину увеличивается, что вызвано истощением зрелых гранул из-за гипергликемии и высвобождением продуктов неполного расщепления проИ из незрелых гранул [11, 12].

В настоящее время измерение концентрации проинсулина используется как потенциальный маркер  $\beta$ -клеточной дисфункции. Нарушение конверсии проИ в инсулин является одной из причин нарушения углеводного обмена различной степени выраженности, клинически характеризуется наличием нарушения толерантности к глюкозе или мягкого СД, имеющего се-

мейный характер [3]. В литературе встречается понятие «проинсулиновый диабет» для описания заболевания, связанного с дефектом проинсулинрасщепляющего фермента, и сопровождающегося высокими концентрациями проИ в крови [13].

Показано, что гиперпродукция проИ является характерной особенностью СД 2 типа, которая проявляется позднее признаков гипергликемии натощак и снижения толерантности к глюкозе [14]. По мнению А. Pfitzner и др. [15] увеличение концентрации проИ является высокоспецифичным предиктом инсулинорезистентности у больных СД 2 типа. Достоверное повышение уровня проИ у больных СД 2 типа по сравнению со здоровыми лицами было продемонстрировано в работе Steiner et al. [16].

Обследование 262 пациентов с СД 2 типа выявило повышение уровня проИ в 3,3 раза. При нарушении толерантности к глюкозе концентрация проИ возрастала в 2,5 раза. В тоже время содержание иммунореактивного инсулина увеличивалось в обоих случаях в два раза, а уровень С-пептида практически не менялся [17]. Высокие концентрации проИ в крови больных СД 2 типа длятся годами, при этом уровень глюкозы сохраняется в пределах 6-11 ммоль/л, что провоцирует развитие сердечно-сосудистых нарушений (ССН), способствует увеличению массы жировой ткани, и как следствие, усугубляет проявление инсулинорезистентности [10].

Иммунохемилюминесцентным методом было установлено, что уровень проИ у пациентов с СД 2 типа без инсулинотерапии ( $63 \pm 58$  пмоль/л,  $p < 0,05$ ) значительно выше, чем у больных ( $30 \pm 24$  пмоль/л), получающих инсулин. Референсные значения проИ в сыворотке здоровых людей колебались от 3 до 20 пмоль/л. Выявлена отрицательная корреляционная зависимость между концентрацией проИ и продолжительностью инсулинотерапии: чем дольше назначалась инсулинотерапия при СД 2 типа, тем ниже уровень проИ. При лечении больных СД 2 типа инсулином более 12 лет показатель проИ был ниже 20 пмоль/л. Уровень глюкозы натощак, триглицеридов и  $\alpha$ -холестерина положительно коррелировали с проИ. Самые низкие показатели проИ, вплоть до неопределяемого уровня, были отмечены у пациентов СД 1 типа, находящихся на инсулинотерапии. Низкие показатели проИ, вероятно, обусловлены аутоиммунным повреждением  $\beta$ -клеток, их истощением вследствие глюкозотоксичности или подавляющим эффектом инсулинотерапии [18].

В наших исследованиях для определения концентрации проИ в образцах сыворотки крови использовали наборы для иммуноферментного анализа (BioVender, Чехия) [19]. В сыворотке крови здоровых лиц концентрация проИ составила  $2,6 \pm 1,3$  пмоль/л. В группе больных СД 2 типа значение проИ было выше уровня контрольной группы в 2 раза ( $5,0 \pm 0,5$  пмоль/л). Больные СД 2 типа были разделены на три группы в зависимости от стадии компенсации углеводного обмена. У пациентов в стадиях компенсированного ( $6,0-6,5$  % HbA1c) и субкомпенсированного диабета ( $6,6-7,0$  % HbA1c) сохранялась низкая концентрация прогормона. У больных в стадии декомпенсированного диабета ( $>7,0$  % HbA1c) наблюдали повышение концентрации проинсулина ( $7,89 \pm 0,70$  пмоль/л) в 2,8 раза по сравнению с аналогичными показателями больных в стадии компенсированного диабета [20]. В этой же группе возрастала концентрация глюкозы, фруктозамина. При этом содержание С-пептида

снижалось в стадии субкомпенсации на 19%, а в стадии декомпенсации – на 27 %. Концентрация проИ в стадии декомпенсации положительно коррелировала с уровнем глюкозы, концентрацией триглицеридов,  $\alpha$ -холестерина и отрицательно коррелировала с индексом атерогенности. Таким образом, измерение концентрации проинсулина может служить важным диагностическим критерием, который позволяет судить о степени декомпенсированности диабета и развитии его осложнений [21].

Концентрация проИ значительно снижалась у больных СД 2 типа с антителами к клеткам островков Лангерганса ICA<sup>+</sup> (*Islet Cell Antibodies - маркеры деструкции В-клеток*) по сравнению с пациентами без антител. Однако в обеих группах уровень проИ был выше, чем у пациентов контрольной группы. Повышению уровня проИ сопутствовала избыточная масса тела или ожирение [22]. Ожирение у беременных с гестационным СД также сопровождалось достоверным увеличением проинсулина в 3 раза, иммунореактивного инсулина в 2,7 раза, С-пептида в 1,6 раз по сравнению с показателями беременных без ожирения [23].

Непропорционально повышенные уровни проИ в сыворотке были отмечены на преддиабетической стадии СД 1 типа [24, 25]. Снижение уровня инсулина, являющееся характерным признаком СД 1 типа, обусловлено аутоиммунной гибелью  $\beta$ -клеток островков Лангерганса. Однако в ряде исследований было замечено, что у больных уровень проИ не снижался, как можно было бы ожидать, а оказался, напротив, выше общепринятой нормы. Были выявлены высокие концентрации проИ и диспропорции в соотношении проИ/инсулин у родных братьев и сестер больных СД 1 типа с ICA<sup>+</sup> или к инсулину. У 50% обследуемых больных отмечали снижение иммунореактивного инсулина и увеличение в 2-3 раза соотношения проИ/И или проИ/С-пептид. При нагрузке глюкозой (0,5 г глюкозы/кг веса) в этой группе уровень иммунореактивного инсулина и С-пептида в четыре раза ниже. В группе с высоким соотношением проИ/инсулин отмечали развитие СД 1 типа в течение 1-28 мес после исследования, таким образом, увеличение проинсулина начинается задолго до развития клинических признаков СД [25].

Поскольку увеличение концентрации проИ отмечалось у ICA<sup>+</sup> родственников, предполагают, что это может отражать незначительные повреждения  $\beta$ -клеток из-за предыдущих иммунологических атак [24]. Высокий уровень проИ был отмечен в работе I. Vauhkonen с соавт. [26] у родственников первой степени родства больных с латентной формой аутоиммунного диабета взрослых с нормогликемией. В работе Н.Ю. Лотош с соавт. [27] было показано, что у половины детей от 3 до 14 лет больных СД 1 типа содержание проИ в 2-4 раза ниже значения принятого за нижнюю границу нормального интервала, что полностью согласуется с общепринятыми представлениями о ключевой роли повреждения и гибели  $\beta$ -клеток островков Лангерганса в патогенезе СД 1 типа. Между уровнями проИ и С-пептида наблюдался высокий коэффициент корреляции. Кроме того, среди обследованных детей у 4% содержание проИ в два раза превышало верхнюю границу нормального интервала значений, а корреляции между концентрацией проИ и С-пептидом не наблюдалось. По мнению авторов, клиническая картина диабета у этой группы больных обусловлена не аутоиммунной деструкцией  $\beta$ -клеток, а, возможно, связана с нарушением этапа превращения проИ

в инсулин. Таким образом, определение проИ в клинической практике позволяет выявлять случаи, отличные от аутоиммунного диабета, и, возможно, применять иную тактику лечения [27].

В литературе обсуждаются причины развития гиперпроинсулинемии у больных СД 2 типа. Предполагают, что увеличение высвобождения проИ у таких пациентов связано с дефектом инсулинового процессинга, что приводит к секреции незрелого инсулинового предшественника, тем самым способствуя ухудшению инсулиновой функции [11]. Уровень проИ повышался при дефиците/снижении активности фермента конвертазы PC1/3 или при нарушении этапа превращения проИ в инсулин за счет мутации в гене инсулина, обуславливающей замену Arg69 на гистидин [28]. Полиморфизм или мутации гена TCF7L2 (*T-клеточный транскрипционный фактор 4*) у больных СД 2 типа проявляется нарушением молекулярного механизма, связанного с изменением конверсии проинсулина в инсулин [29]. Гетерозиготные миссенс-мутации (*точечные мутации*) в кодирующем регионе гена INS, приводящие к конформационным изменениям молекулы проИ и накоплению неактивного белка с измененными свойствами, описаны в литературе [30, 31]. Таким образом, неверное сворачивание проИ вследствие мутаций или генетической предрасположенности приводит к избыточному накоплению проинсулина в ЭР, [32] и является дефектом, действующим как «первый удар» по  $\beta$ -клеткам [33].

Известно, что ЭР обеспечивает синтез и созревание белков, предназначенных для секреции. Созревание любой белковой молекулы предполагает ее «фолдинг» (*от англ. to fold — «укладывать, сворачивать»*) - самопроизвольное приобретение единственно правильного трехмерного строения. Ошибка в процессе фолдинга ведёт к накоплению неправильно свернутых белков, функциональной перегрузки аппарата ЭР и нарушению созревания белковых молекул, так называемому «стрессу ЭР» [34]. Перегрузка ЭР (мисфолдинг) приводит к накоплению проинсулина в просвете ЭР, нарушению функции  $\beta$ -клеток, развитию и прогрессированию СД 2 типа [33]. Неправильное сворачивание проинсулина является фенотипом, который очень тесно связан с недостаточной выработкой инсулина и диабетом [32].

Аутосомно-доминантная мутация кодирующей последовательности в гене INS, влияющие на сворачивание проИ в эндоплазматической сети, вызывает синдром индуцированного диабета молодости. Мутантный проИ экспрессируется совместно с нормальным проИ и удерживает последний в ЭР, заставляя  $\beta$ -клетки использовать секреторные гранулы инсулина, приводя к их постепенному истощению. Недостаточность инсулина повышает уровень глюкозы в крови, которая стимулирует ещё большее производство мутантного проИ, усиливая стресс ЭР и апоптоз  $\beta$ -клеток [35]. При гипергликемии в организме резко возрастает нагрузка на ЭР  $\beta$ -клеток и создаются условия для апоптоза [34].

S.Alarcon и соавт. [36], используя модели мышей C57BL/6J db/db и C57BLKS/J db/db с ожирением для экспериментального моделирования СД 2 типа, показали, что в мышечных  $\beta$ -клетках синтез проинсулина повышался в 4 и 11 раз, соответственно, по сравнению с островками контрольных крыс дикого типа без ожирения. Скорость синтеза проинсулина, измеренная включением L-[3,4,5-<sup>3</sup>H] лейцина в проинсулин, также заметно увеличивалась в островках обеих линий мышей db/db.

Кроме того, биосинтез проинсулина был чувствителен к глюкозе (измерено при 17 ммоль/л по сравнению с 3 ммоль/л глюкозы). Ультраструктурный анализ  $\beta$ -клеток обоих штаммов мышей db/db показал значительное снижение количества и истощение зрелых гранул инсулина, увеличение числа незрелых гранул, расширение аппарата Гольджи и ЭР, что, по мнению авторов, является результатом ускоренной, дисфункциональной обработки проИ, а не следствием недостаточного синтеза проинсулина [36]. Расширение ЭР в островках обеих линий мышей не сопровождалось увеличением фосфорилирования PERK (*Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*) и экспрессии ССААТ-энхансер-связывающих белков (СНОР), что характерно для "стресса" ЭР. Фактически, наблюдаемый повышенный биосинтез проинсулина в островках мышей с диабетом 2 типа, страдающих ожирением, является результатом адаптивной, а не стрессовой реакции ЭР. Создание стресса ЭР очень маловероятно, так как он является ингибитором синтеза белка [36].

По мнению С. J. Nolan et al. [37] дисфункция  $\beta$ -клеток при СД 2 типа, связанном с ожирением, может быть следствием аномальной обработки проинсулина, которой способствуют такие факторы, как цитокины и токсины окружающей среды. Островковые  $\beta$ -клетки будут подвергаться наибольшему риску, в случае, если они имели врожденную предрасположенность реагировать на избыток питательных веществ или других стрессоров [37]. Наиболее эффективными в нарушении созревания инсулина являются провоспалительные цитокины: интерлейкин-23 (ИЛ), ИЛ-24 и ИЛ-33 [38]. В этих условиях нарушается естественный фолдинг проИ, что становится «вторым ударом» по ЭР и  $\beta$ -клеткам [33].

У мышей с ожирением C57BL/6 (HFDIO) нейтрализация ИЛ-23 и ИЛ-24 с помощью антител частично улучшало функциональное качество секретируемого инсулина. Лечение мышей противовоспалительным ИЛ-22 устраняло дефекты обработки проинсулина, стимулировало секрецию эффективного инсулина и полностью восстанавливало гомеостаз глюкозы и чувствительность к инсулину [38].

Развитие аутоиммунной формы сахарного диабета у крыс сопровождается продукцией цитокинов, которые могут приводить к деструкции  $\beta$ -клеток островков Лангерганса. Действительно, добавление комбинации цитокинов к изолированным островкам крыс приводило к разрушению  $\beta$ -клеток в течение 24 часов [39]. В человеческих  $\beta$ -клетках цитотоксический эффект наблюдали только через 3-е суток после инкубации с цитокинами (40). В культуре человеческих островков при добавлении ИЛ-1 $\beta$  (50 ед/мл) + ИФН- $\gamma$  (1000 ед/мл) в течение 1-3 дней на 40% снижалось содержание внутриклеточного инсулина, что не связано с процессами цитодеструкции, так как количество некротических или апоптотических клеток не изменялось. Секрета проИ статистически значимо увеличивалась через 4, 24 и 72 часа. В присутствии цитокинов конверсия проинсулина в инсулин замедлялась в 1,4 раза, при этом соотношение проинсулина/инсулин было в 3-6 раз выше, чем в контрольных клетках. Цитокины снижали на 40-45% количество конвертаз PC1 и PC2, но не влияли на экспрессию мРНК ферментов, что, вероятно, свидетельствовало о нарушении структуры конвертаз на посттранскрипционном уровне [41]. Таким образом, было показано, что длительное воздействие более чем одного цитокина, в частности ИЛ-1 $\beta$ + ИФН- $\gamma$ , может представлять одну из

причин непропорционального повышения уровня проИ в сыворотке крови в стадии преддиабета. Это условие может возникнуть в островках с инфильтрирующими иммунными клетками при длительном воздействии цитокинов [40].

Различная антидиабетическая терапия оказывает влияние на уровень проИ у больных СД. Терапия пероральными препаратами сульфонилмочевины увеличивает уровень проИ. Под влиянием препаратов стимулирующих секрецию инсулина преобразование проИ становится неполным из-за ограниченной каталитической вместимости протеаз [6].

Гиперпроинсулинемия может быть обусловлена увеличением спроса на инсулин (из-за инсулинорезистентности), истощением пула зрелых гранул и мобилизацией инсулина из резервного пула, который содержит значительное количество незрелого инсулинового предшественника [11]. Данная теория нашла подтверждение у больных с частичной резекцией поджелудочной железы, в крови которых увеличивалось соотношение проИ/инсулин [42].

Не исключено, что увеличение проИ связано с низкой активностью матриксных металлопротеиназ [ММП] в сыворотке крови больных СД 2 типа [43]. Нами было обнаружено, что в стадии декомпенсации, наряду с возрастанием уровня глюкозы, гликированного гемоглобина и концентрации проИ снижались активность ММП и концентрация С-пептида. В результате отношение концентрации проИ к активности ММП на стадиях компенсации и субкомпенсации СД 2 типа было примерно 1:50, в то время как на стадии декомпенсации – 1:12. Таким образом, оценка соотношения этих показателей в сыворотке крови может служить в качестве дополнительного диагностического критерия стадии декомпенсации диабета и степени тяжести развития его осложнений [44]. Как известно, ММП вносят основной вклад в деградацию внеклеточного матрикса. Нарушение регулируемой активности ММП при СД ведет к повышенной продукции вещества внеклеточного матрикса, интенсивному процессу склерозирования ткани [45] и развитию осложнений СД [46].

### Регуляторные функции проинсулина

В течение нескольких десятилетий проИ рассматривали как белок-предшественник инсулина с очень низкой метаболической активностью. Однако, обнаружение экспрессии проИ не только в поджелудочной железе, но и в других тканях, дало возможность предположить, что проИ может иметь и иные функции [47].

Известно, что инсулин связывается с изоформами А и В рецептора инсулина (RI) с высокой аффинностью. ПроИ, напротив, с высокой аффинностью связывается только с изоформой RI-A, которая является преобладающей или исключительной формой, экспрессируемой в тканях плода, створочных клетках и мозге взрослого млекопитающего [48]. Форма рецептора RI-A является единственной изоформой, экспрессируемой в нейронах [49]. В культивируемых клетках наномолярные концентрации проИ приводили к сопоставимой с активностями инсулина стимуляции фосфорилирования RI-A и активации пути ERK (*extracellular signal-regulated kinase*, один из ключевых сигнальных путей MAPK). При этом проИ приводил к меньшей активации протеинкиназы В, обычно обозначаемой как АКТ-киназа (*ключевой фермент сигнального пути PI3K/AKT*) и не связывался с

рецепторами IGF-1 (insulin-like growth factor 1) или гибридными рецепторами IR/IGF-IR [50].

Взаимодействие проИ с RI-A оказывает антиапоптотический и нейропротекторный эффекты в развивающейся и постнатальной нервной системе [48]. Экспрессия проИ была выявлена на ранних стадиях развития эмбриона цыплят, особенно в нервной системе. Причём экспрессия проИ являлась финальной стадией. Регуляция экспрессии мРНК проИ у эмбрионов в отличие от  $\beta$ -клеток поджелудочной железы не регулировалась глюкозой. Нейрональный проИ, вероятно, секретируется конститутивным путём, так как в культивируемых нейронах быстрая секреция проинсулина в среду происходила в пределах нескольких часов, даже без секретогенных факторов. Авторы предположили, что проинсулин способствует клеточной пролиферации, дифференцировке и выживанию эмбриональной нервной системы цыплёнка или мыши. Интересно, что блокировка антителами рецепторов проИ индуцировала апоптоз в сетчатке цыплёнка, уменьшая число нейронов [51]. Подобный апоптотический эффект наблюдали при использовании антисмысловых олигонуклеотидов, применение которых направлено на блокаду сигнальных путей проИ (52).

Матричная РНК проИ была обнаружена в сетчатке глаза на раннем этапе эмбрионального развития мыши. Первоначальная высокая активность проИ уменьшалась по мере созревания сетчатки. Было показано, что антиапоптотический эффект проИ в культуре сетчатки сопоставим с эффектами инсулина или IGF-1 [53]. Однако введение экзогенного проИ *in ovo* (в эмбрион куриных яиц) приводило к уменьшению естественного апоптоза и аномалиям развития нервной трубки и оптических везикул. Оказалось, что контролируемое регулирование экспрессии и функции проИ имеет решающее значение для правильного развития нервной системы [51]. Перечисленные факты свидетельствуют о том, что секретируемый проИ является важным регуляторным фактором [51].

В экспериментах на мышинной модели дистрофии сетчатки показано, что проинсулин предотвращает патологическую гибель клеток сетчатки. У линии мышей rd10 (retinal degeneration 10) впервые месяцы жизни развивается прогрессирующая ретинальная дегенерация, приводящая к слепоте. Трансгенная экспрессия человеческого проИ задерживала процесс потери зрения, что коррелировало со снижением гибели клетки и сохранением фоторецепторного слоя [47]. Нейропротекторное действие проИ было показано на мышинной и крысиной моделях пигментного ретинита (ПР). Внутримышечное введение аденоассоциированного вирусного вектора (Adeno-associated dependovirus A, AAV), несущего ген проИ человека, способствовало замедлению дегенерации фоторецепторов и потери зрения [48].

Терапевтический потенциал проИ, как нейропротекторной молекулы, был проверен на модели аутосомно-доминантного ПР у трансгенных крыс P23H. Модель характеризуется модификацией гена Rho, приводящего к агрегации родопсина и дегенерации фоторецепторов. Оценивали терапевтический эффект проинсулина человека (hPi+) на дегенерацию фоторецепторных клеток и функциональную активность сетчатки. Гомозиготные крысы P23H получили внутримышечную инъекцию AAV1, экспрессирующего проИ человека (hPi+) или нулевой вектор AAV1 (hPi-). В ходе эксперимента было

выявлено ослабление ухудшения зрения, которое коррелировало с задержкой дегенерации фоторецепторов и сохранением цитоархитектоники сетчатки. Крысы hPi+ имели на 49% больше фоторецепторов, чем контрольные животные, у них были сохранены пресинаптические и постсинаптические элементы, а также синаптические контакты между фоторецепторами и биполярными или горизонтальными клетками. Эти эксперименты показывают, что экспрессия hPi+ сохраняет структуру и функцию фоторецепторов, а также их контакты с постсинаптическими нейронами. Авторы исследования считают важным дальнейшее развитие терапии на основе проИ для лечения пигментного ретинита [54].

На мышинной модели Pde6brd10 проверяли, оказывает ли нейропротекторные эффекты в сетчатке внутриглазное лечение биоразлагаемыми микросферами на основе поликислот (молочной и гликолевой) с метилированными рекомбинантным проИ человека. Дегенерация сетчатки у мыши rd10 была замедлена однократной интравитреальной инъекцией микросферы. Проинсулин вызывал быстрый и эффективный нейропротекторный эффект, что может представлять собой будущий потенциально возможный способ доставки для лечения пигментного ретинита на основе проИ [55].

У мышей SAMP8 (модель преждевременного старения мозга, которая проявляет некоторые признаки болезни Альцгеймера) AAV-опосредованная экспрессия проИ снижала выработку нейровоспалительных маркеров (TNF- $\alpha$ , интерлейкина-1 $\beta$  и антипротеазного  $\alpha$ 2-макробулина) в гиппокампе через 5 мес после инъекции. Важно отметить, что эти нейропротекторные эффекты коррелировали с улучшением когнитивных функций мышей в задачах пространственного распознавания [48].

Привлекает особое внимание влияние инсулина на нейронную пластичность посредством регуляции поглощения, высвобождения и дегенерации дофамина и норадреналина; его участие в контроле над чувствительностью постсинаптических рецепторов [49]. Существует множество доказательств того, что нарушение активности инсулина в головном мозге нарушает функции нейронов и синаптогенез [49]. Однако в большинстве исследований воздействия инсулина на мозг мало внимания уделялось потенциальному вкладу местного проинсулина в наблюдаемые результаты [48].

Kojima et al. [56] впервые идентифицировали популяцию лейкоцитов, продуцирующих мРНК проИ, так называемые PI-producing bone marrow derived cells (PI-BMDCs или PI+). Клетки PI+ также обнаруживались в тканях мышей с экспериментальным диабетом, вызванным стрептозотоцином (STZ), и отсутствовали у контрольных мышей [57]. Инъекции глюкозы недиабетическим мышам индуцировали появление PI+ в течение 1-3 дней [56], а инверсия STZ-диабета инсулином вызывала быстрое снижение их числа [57]. Клетки PI+ часто экспрессировали провоспалительные маркеры, такие как TNF- $\alpha$  [56, 57, 58]. Резко увеличивалось число макрофагов, секретирующих CD11c (маркер классической активации макрофагов). Провоспалительные макрофаги не распределялись случайным образом по всей висцеральной жировой ткани, а формировали кластер вокруг мертвых адипоцитов, так называемые "crownlike" структуры. Внутри этих структур макрофаги поглощали липиды с образованием пенистых клеток или образовывали многоядерные синцитии [58].

Ожирение, индуцированное высокожировой диетой (60%) в течение 16 нед, у мышей C57BL/6/J приводило к накоплению макрофагов в жировой ткани (МЖТ). Гипергликемия, развивающаяся в результате такой диеты, индуцирует появление проИ из клеток костного мозга мышей. В жировой ткани гонад иммуногистохимически были обнаружены PI+-продуцирующие клетки, которых не было у мышей на стандартной диете. Такие клетки обильно заселяли брыжеечную, окологочечную ткани и редко встречались в печени и скелетной мускулатуре. Показано, что 95% клеток, позитивно окрашенных на PI+, коэкспрессировали F4/80 (*маркёрный антиген клеточной поверхности макрофагов*). Кроме того, 59% PI+ коэкспрессировали CD11c (*экспрессирован в основном на миелоидных клетках, экспрессия повышается под действием медиаторов воспаления*) и 68% - TNF- $\alpha$ . Снижение уровня глюкозы с помощью различных гипогликемических средств (инсулин Гларгин и Флоридзин - ингибиторы реабсорбции глюкозы в почечных канальцах) предотвращало накопление PI+-МЖТ и воспаление в ней. Применение стратегии, основанной на использовании дифтерийного токсина, для выборочного удаления PI+- из МЖТ, приводило к почти полному исчезновению сложных "crownlike" структур, улучшало гомеостаз глюкозы, снижало резистентность к инсулину [58].

Клетки PI+ также обнаруживали в периферической нервной системе STZ-диабетических мышей, где они играли решающую роль в патогенезе диабетической невропатии [59]. PI-BMDCs находили у мышей с умеренной гипергликемией, получающих жировую диету и у мышей линии C57BL/6J ob/ob. Интересно, что клетки PI-BMDCs являются многочисленными в висцеральной жировой ткани мышей с моделью СД 2 типа [56].

Роль макрофагов при СД 2 типа ещё плохо изучена, непонятен механизм активации макрофагов и её зависимость от степени гликемии. Значение PI-BMDCs клеток в развитии диабета предстоит ещё выяснить.

Нарушение синтеза или секреции инсулина приводит к хроническому повышению свободных жирных кислот (СЖК). Влияние последних на процессинг проИ и прогормон-конвертазы PC2 и PC1/PC3 исследовали в клетках линии MIN6, являющихся экспериментальной моделью для изучения деталей биосинтеза проинсулина. Через 7 дней культивирования в клетках под действием СЖК увеличивался процент внутриклеточного проИ на 26%, а в культуральной среде - на 75%; при этом секреция инсулина снижалась на 50%. Уровни клеточных конвертаз PC2 и PC3, проанализированные с помощью вестерн-блоттинга, были снижены. Кроме того, нарушалась конверсия прогормона PC2 и прогормона PC3 в зрелые формы [28].

Изучение новой роли проИ в регуляции метаболических путей привели к включению прогормона инсулина в суперсемейство сигнальных факторов, которые у человека также включают в себя инсулиноподобные факторы роста (IGFs-1,-2 -7), подсемейство релаксин-подобных пептидов [60]. Все они обладают обширным функциональным спектром, включая участие в регуляции метаболизма углеводов и липидов, отвечая за пролиферацию и рост клеток [48].

### Перспективы использования проинсулина

В настоящее время в лечебной практике прибегают к иммунотерапии с использованием коротких иммуногенных пептидов, связанных с аутоиммунным заболеванием для индукции специфической толерантности Т-клеток к

антигену. Такая терапия была успешной для некоторых пациентов с аллергией, где она позволяла избежать проблемы использования целых антигенов, которые могут вызывать гиперчувствительность, опосредованную иммуноглобулином Е [61].

СД 1 типа является хроническим аутоиммунным заболеванием, характеризующимся прогрессирующей, иммуноопосредованной потерей массы и функции  $\beta$ -клеток. М.А. Ali и соавт. [62] провели рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование, чтобы определить, может ли иммунопептидная терапия проИ быть безопасной и эффективной в отношении пациентов с недавно диагностированным СД 1 типа (через 100 дней от начала постановки диагноза). Одним из критериев включения в исследуемую группу наличие генотипа DRB1\*0401. Последний является группоспецифическим вариантом гена HLA-DRB1 и одновременно маркёром предрасположенности к СД 1 типа [61]. Ограниченный иммунодоминантный проинсулиновый пептид C19-A3 вводили внутривенно каждые 2 или 4 нед в течение 6 месяцев, с последующим 6-месячным периодом наблюдения. В группе, получавших плацебо, наблюдали значительное снижение С-пептида на 3, 6, 9 и 12 месяце по сравнению с исходным уровнем. В группе, получавших проинсулиновый пептид каждые 2 или 4 нед, не наблюдали значительных изменений данного показателя. В группе, получавших плацебо, ежедневная доза инсулина увеличилась на 50% за 12 мес, но осталась неизменной в экспериментальной группе. Исследование показало, что лечение, по-видимому, модифицирует ответы Т-клеток и не влияет на остаточную функцию  $\beta$ -клеток. Отсутствие снижения С-пептида у пациентов, получавших лечение, была связана с проинсулинстимулированной продукцией интерлейкина-10 (*иммуносупрессивный цитокин*), повышенной экспрессией FoxP3 (*транскрипционный фактор, ответственный за развитие и функционирование регуляторных Т-клеток, способствующих снижению иммунного ответа*), низкими базовыми уровнями активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8 Т-клетки). Таким образом, проинсулиновая пептидная иммунотерапия оказалась безопасной, не снижала функции  $\beta$ -клеток и была связана с антиген-специфической и неспецифической иммунной модуляцией. Эти обнадеживающие результаты подтверждают необходимость более масштабного исследования для изучения эффективности пептидной проИ терапии для лечения СД [62].

### Заключение

Таким образом, в настоящее время изучены все основные этапы синтеза проИ, С-пептида и инсулина. Измерение концентрации проИ в сыворотке крови используется как потенциальный маркер функциональной активности поджелудочной железы, а также может являться важным диагностическим критерием, который позволяет судить о степени декомпенсированности диабета и развитии его осложнений. При СД 2 типа и некоторых формах СД 1 типа соотношение проинсулин/инсулин увеличивается. Одной из причин возникновения проинсулинемии лежит ошибка в процессе фолдинга молекулы проинсулина. Перегрузка ЭР неправильно свёрнутым инсулиновым предшественником (мисфолдинг) приводит к нарушению функции  $\beta$ -клеток, развитию и прогрессированию СД. В последнее время особое внимание уделяется изучению новой роли проИ в мета-

болических путях, в том числе, регулирование выживаемости клеток и их роста во время раннего развития нервной системы в физиологических условиях, во время старения и при патологических процессах. Исследования в этом направлении привели к возможности включения прогормона инсулина в суперсемейство сигнальных факторов. Изучаются антиапоптотический эффект и нейротропная активность проинсулина и его потенциал в качестве терапевтического инструмента при нейродегенеративных состояниях центральной нервной системы, особенно при дистрофиях сетчатки. Исследуются возможности иммунопептидной терапии с использованием проИ для лечения некоторых форм СД.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп.1, 2, 6, 8, 9, 11, 12, 14-16, 18, 22, 24-26, 28-30, 32, 33, 35-42, 44-60, 62 см. REFERENCES)

- Смирнова О.М. Роль комбинированной терапии в лечении сахарного диабета 2. *Consilium medicum*. 2005; 7(9):739-43.
- Ваизова О.Е. Инсулин: от открытия до эволюции. В кн.: Ваизова О. Е., Столяров В. А., Самойлова Ю. Г., ред. *Инсулин и инсулинотерапия*. Томск: Печатная мануфактура; 2009: 2-23.
- Балаболкин М. И., ред. Эндокринология: Учебник. 2-е изд. М.: Универсум паблишинг; 1998. 416 с. *Invest*. 2002; 32(Suppl 3): 14-23.
- Дедов И.И., Смирнова О.М., Кононенко И.В. Новые представления о нарушении глюкозостимулированной секреции инсулина при сахарном диабете 2 типа. Клинические последствия. *Сахарный диабет*. 2015; 18 (3): 23-31.
- Каналес Х., Богомолов М.В., ред. *Виртуозная инсулинотерапия*. М.: Диабетическая газета; 2002.
- Фаллер Д. М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки: руководство для врачей. М.: Бином-Пресс; 2011.
- Майоров А.Ю. Инсулинорезистентность в патогенезе сахарного диабета 2 типа. *Сахарный диабет*. 2011; 14(1): 35-43.
- Зубова А.В., Потеряева О.Н., Русских Г.С., Геворгян М.М. Иммуноферментный анализ проинсулина в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 типа. *Медицина и образование в Сибири*. 2015; №1. [http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1656](http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1656).
- Зубова А.В., Потеряева О.Н., Русских Г.С., Геворгян М.М. Содержание проинсулина и гликозилированного гемоглобина в зависимости от стадии компенсации сахарного диабета. *Медицина и образование в Сибири*. 2015; 3. <http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/pdf.php?id=1812>.
- Потеряева О.Н., Русских Г.С., Зубова А.В., Геворгян М.М. Проинсулин - диагностический биохимический маркер декомпенсированного сахарного диабета 2 типа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(5): 278-282.
- Севко Т.В., Доброхотова Ю.Э., Иванова Т.А. Генетические маркеры инсулинорезистентности при гестационном сахарном диабете. *Сахарный диабет*. 2009; 12(4): 38-41.
- Лотош Н.Ю., Селищева А.А., Надоров С.А., Бадыштов Б.А., Волков И.Э., Савельев С.В. Уровень проинсулина в крови детей, больных сахарным диабетом 1 типа разной продолжительности. *Биомедицинская химия*. 2013; 59(5): 563-9.
- Тихонович Ю.И., Петрайкина Е.Е., Рыбкина Е.Г., Гаряева И.В., Тюльпаков А.Н. Моногенный сахарный диабет, обусловленный мутацией в гене (INS). *Проблемы эндокринологии*. 2013; 59(2): 45-48.
- Дедов И.И., Смирнова О.М., Горельшев А.С. Стресс эндоплазматического ретикулума: цитологический сценарий патогенеза заболеваний человека. *Проблемы эндокринологии*. 2012; 58(5):
- Потеряева О.Н., Русских Г.С., Панин Л.Е. Анализ активности матриксных металлопротеиназ и  $\alpha$ -1 протеиназного ингибитора в сыворотке крови больных сахарным диабетом 2 типа. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011; 152 (11): 509-10.
- Алексеев Л.П., Дедов И.И., Хаитов Р.М., Болдырева М.Н., Трофимов Д.Ю., Петеркова В.А., Кураева Т.Л., Абрамов Д.Д. Иммуногенетика сахарного диабета 1 типа — от фундаментальных исследований к клинике. *Вестник РАМН*. 2012; 67(1): 75-80.
- Steiner D. F. The proinsulin C-peptide - a multirole model. *Experimental Diabetes Research*. 2004; 5(1): 7-14.
- Brandenburg D. History and diagnostic significance of C-peptide. *Exp. Diabetes Res*. 2008; 576862.
- Smirnova O.M. The role of combination therapy in the treatment of diabetes mellitus 2. *Consilium medicum*. 2005; 7(9): 739-43. (in Russian)
- Vaizova O.E. Insulin: from discovery to evolution. In: Insulin and insulin therapy [Insulin I insulinoterapiya]. Vaizova O. E., Stol-yarov V.A., Samoylova Yu. G., eds. Tomsk: Pechatnaya manufak-tura; 2009: 2-23. (in Russian)
- Balabolkin M. I., ed. Endocrinology {Endokrinologiya}. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: Universum Publishing; 1998.
- Boden G., Shulman G.I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest*. 2002; 32(Suppl 3): 14-23.
- Dedov I.I., Smirnova O.M., Kononenko I.V. New concepts of glucose-induced insulin secretion in the development of type 2 diabetes: clinical implications. *Sakharnyi diabet*. 2015; 18 (3): 23-31. (in Russian)
- Kahn S.E., Halban Ph. A. Release of incompletely processed proin-sulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia of NIDDM. *Diabetes*. 1997; 46(11): 1725-32.
- Haataja L., Snapp E., Wright J.M., Liu A.B. Hardy M.B. Wheeler et al. Proinsulin intermolecular interactions during secretory trafficking in pancreatic cells. *J. Biol. Chem*. 2013; 288(3): 1896-906.
- Kanales Kh., Bogomolov M.V., eds. *Virtuoso insulin therapy [Virtuoznaya insulinoterapiya]*. Moscow: *Diabeticheskaya gazeta*; 2002. 2014; 3 (107): 6-70. (in Russian)
- Breuer T. G. K., Menge B. A., Banasch M., Uhl W., Tannapfel A., Schmidt W.E., Nauck M. A. et al. Proinsulin levels in patients with pancreatic diabetes are associated with functional changes in insulin secretion rather than pancreatic b-cell area. *Eur. J. Endocrinol*. 2010; 163: 551-8.
- Skyler J.S. Atlas of Diabetes. 4<sup>th</sup> ed. Miami: Springer; 2012.
- Faller D. M., Shields D., eds. *Molecular biology of the cell: a guide for physicians*. Moscow: Binom-Press; 2011. (in Russian)
- Birkeland K.I., Torjesen P.A., Eriksson J., Vaaler S., Groop L. Hyperproinsulinemia of type 2 diabetes is not present before the development of hyperglycemia. *Diabetes Care*. 1994; 17: 1307-10.
- Pfutzner A., Weber M.M., Forst T. A biomarker concept for assessment of insulin resistance, b-cell function and chronic systemic inflammation in type 2 diabetes mellitus. *Clin. Lab*. 2008; 54(11-12): 485-90.
- Steiner D. F. Chemistry and biosynthesis of the islet hormones. In: DeGroot L., Jameson J. L., eds. *Endocrinol*. Philadelphia: Elsevier; 2006: 925-60.
- Mayorov A.Yu. Insulin resistance in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Sakharnyi diabet*. 2011; 14(1): 35-43. (in Russian)
- Wu T-J., Lin C-L., Taylor R. L., and Kao P. C. Proinsulin level in diabetes mellitus measured by a new immunochemiluminometric assay. *Ann. Clin. Lab. Sci*. 1995; 25(6): 467-74.
- Zubova A.V., Poteryaeva O.N., Russkikh G.S., Gevorgyan M.M. Immunoassay analysis of proinsulin in serum of patients with type 2 diabetes mellitus. *Meditsina I obrazovanie v Sibiri*. 2015; 1: [http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text\\_full.php?id=1655](http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1655) (in Russian)
- Zubova A.V., Poteryaeva O.N., Russkikh G.S., Gevorgyan M.M. Content of pro-insulin and glycosylated hemoglobin depending on the stage of diabetes mellitus compensation. *Meditsina I obrazovanie v Sibiri*. 2015; 3: <http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/pdf.php?id=1812> (in Russian)
- Poteryaeva O.N., Russkikh G.S., Zubova A.V., Gevorgyan M.M. Proinsulin as a diagnostic biochemical marker of decompensated diabetes mellitus type II. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(5): 278-82. (in Russian)
- Gottsater A., Owens D.R., Luzio S., Sundkvist G. Proinsulin secretion during the first 3 years after diagnosis in diabetic patients with and without islet cell antibodies. *Diabetes care*. 1996; 19 (6): 659-62.
- Sebko T.V., Dobrokhotova Yu.E., Ivanova T.A. Genetic markers of insulin resistance with gestational diabetes. *Sakharnyi diabet*. 2009; 12(4): 38-41. (in Russian)

24. Spinas G.A., Snorgaard O., Hartling S.G., Oberholzer M., Berger W. Elevated proinsulin levels related to islet cell antibodies in first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes Care*. 1992; 15(5): 632-37.
25. Røder M.E., Knip M., Hartling S.G., Akerblom H.K., Binder C. Disproportionately elevated proinsulin levels precede the onset of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings with low first phase insulin responses. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism*. 1994; 79(6): 1570-5.
26. Vauhkonen I., Niskanen L., Knip M., Mykkänen L.M., Haffner S., Uusitupa M., Laakso M. Subtle hyperproinsulinaemia characterises the defective insulin secretory capacity in offspring of glutamic acid decarboxylase antibody-positive patients with latent autoimmune diabetes mellitus in adults. *Eur. J. Endocrinol.* 2005; 153(2): 265-73.
27. Lotosh N.Yu., Selishcheva A.A., Nadorov S.A., Badyshov B.A., Volkov I.E., Saveljev S.V. The proinsulin level in the blood of children with type 1 diabetes mellitus of various duration. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2013; 59(5): 563-9. (in Russian)
28. Furukawa H., Carroll L.J., Swift H.H., Steiner D.F. Long-term elevation of free fatty acids leads to delayed processing of proinsulin and progormon convertases 2 and 3 in pancreatic beta-cell line MIN6. *Diabetes*. 1999; 48(7): 1395-401.
29. Schafer S.A., Machicao F., Fritsche A., Haring H.U., Kantartz K. New type 2 diabetes risk genes provide new insights in insulin secretion mechanisms. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2011; 93(Suppl. 1): S9-24.
30. Stoy J., Edghill E.L., Flanagan S.E., Ye H., Paz V.P., Pluzhnikov A., Below J.E., Hayes M.G., Cox N.J., Lipkind G.M., Lipton R.B., Greeley S.A., Patch A.M., Ellard S., Steiner D.F., Hattersley A.T., Philipson L.H., Bell G.I. Neonatal Diabetes International Collaborative Group. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104 (38): 15040-4.
31. Tikhonovich Iu.V., Petriakina E.E., Rybkina I.G., Gariaeva I.V., Tiul'pakov A.N. Monogenic diabetes mellitus associated with a mutation in the insulin gene (INS). *Problemy endokrinologii*. 2013; 59(2): 45-8. (in Russian)
32. Liu M., Weiss M.A., Arunagiri A., Yong J., Rege N., Sun J., Haataja L., Kaufman R.J., Arvan P. Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. *Diabetes Obes. Metab.* 2018; 20(Suppl 2): 28-50.
33. Sun J., Cui J. He Q., Chen Z., Arvan P., Liu M. Proinsulin misfolding and endoplasmic reticulum stress during the development and progression of diabetes. *Molecul. Aspects Medicine*. 2015; 42: 105-18.
34. Dedov I.I., Smirnova O.M., Gorelyshev A.S. Endoplasmic reticulum stress: a cytological "scenario" of the pathogenesis of human diseases. *Problemy endokrinologii*. 2012; 58(5): 57-65. (in Russian)
35. Lui M., Hodish I., Haataja L., Lara-Lemus R., Rajpal G., Wright J., Arvan P. Proinsulin misfolding and diabetes: mutant *INS* gene-induced diabetes of youth. *Trends. Endocrinol. Metab.* 2010; 21(11): 652-9.
36. Alarcon C., Boland B.B., Uchizono Y., Moore P.C., Peterson B., Rajan S., Rhodes O.S., Noske A.B., Haataja L., Arvan P., Marsh B.J., Austin J., Rhodes C.J. Pancreatic  $\beta$ -cell adaptive plasticity in obesity increases insulin production but adversely affects secretory function. *Diabetes*. 2016; 65: 438-50.
37. Nolan C.J. and Delghingaro-Augusto V. Reversibility of defects in proinsulin processing and islet b-cell failure in obesity-related Type 2 diabetes. *Diabetes*. 2016; 65(2): 352-4.
38. Hasnain S.Z., Borg D.J., Harcourt B.E., Tong H., Sheng Y.H., Ng C.P., Das I., Wang R., Chen A.C., Loudovaris T., Kay T.W., Thomas H.E., Whitehead J.P., Forbes J.M., Prins J.B., McGuckin M.A. Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. *Nat. Med.* 2014; 20(12): 1417-26.
39. Rabinovitch A. Roles of cytokines in IDDM pathogenesis and islet  $\beta$ -cell destruction. *Diabetes Reviews*. 1993; 1: 215-40.
40. Delaney C.A., Pavlovic D., Hoorens A., Pipeleers D.G., Eizirik D. L. Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology*. 1997; 138: 2610-4.
41. Hostens K., Pavlovic D., Zambre Y., Ling Z., Van Schravendijk C., Eizirik D. L., Pipeleers D.G. Exposure of human islets to cytokines can result in disproportionately elevated proinsulin release. *J. Clin. Invest.* 1999; 104(1): 67-72.
42. Seaquist E.R., Kahn S.E., Clark P.M., Hales C.N., Porte D. Jr., Robertson R.P. Hyperproinsulinemia is associated with increased b-cell demand after hemipancreatectomy in humans. *J. Clin. Investigation*. 1996; 97: 455-60.
43. Poteryaeva O.N., Russkikh G.S., Panin L.E. Analysis of the activity of matrix metalloproteinases and  $\alpha$ -1 proteinase inhibitor in the serum of patients with type 2 diabetes. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* (BEEM). 2011; 152 (11): 509-10. (in Russian)
44. Poteryaeva O.N., Russkikh G. S., Zubova A.V., Gevorgyan M.M., Usynin I.F. Changes in activity of matrix metalloproteinases and serum concentration of proinsulin and C-peptide depending on the compensation stage of type 2 diabetes mellitus. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2018; 164(6): 730-3. (in Russian)
45. McLennan S.V., Kelly D.J., Schache M., Waltham M., Dy V., Langham R.G., Yue D.K., Gilbert R.E. Advanced glycation end products decrease mesangial cell MMP - 7: a role in matrix accumulation in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2007; 72(4): 481-8.
46. Thraillkill K.M., Bunn R.C., Fowlkes J.L. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Endocrine*. 2009; 35(1): 1-10.
47. De la Rose E.J., De Pablo F. Proinsulin: from hormonal precursor to neuroprotective factor. *Front. Mol. Neurosci.* 2011; 4(20): 1-7.
48. De Pablo F., Hernández-Sánchez C., De la Rose E.J. The prohormone proinsulin as a neuroprotective factor: past history and future prospects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018; 11: 426.
49. Gralle M. The neuronal insulin receptor in its environment. *J. Neurochem*. 2017; 140(3): 359-367.
50. Belfiore A., Frasca F., Pandini G., Sciacca L., Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr. Rev*. 2009; 30(6): 586-623.
51. Hernández-Sánchez C., Mansilla A., de la Rosa, E. J. and de Pablo F. Proinsulin in development: new roles for an ancient prohormone. *Diabetologia*. 2006; 49 (6): 1142-50.
52. Hernández-Sánchez C., Rubio E., Serna J., De la Rosa E. J., De Pablo F. Unprocessed proinsulin promotes cell survival during neurulation in the chick embryo. *Diabetes*. 2002; 51 (3): 770-7.
53. Valenciano A. I., Corrochano S., de Pablo F., De la Villa P. and De la Rosa E. J. Proinsulin/insulin is synthesized locally and prevents caspase- and cathepsin-mediated cell death in the embryonic mouse retina. *J. Neurochem*. 2006; 99(2): 524-36.
54. Fernández-Sánchez L., Lax P. Isiegas C., Ayuso E., Ruiz J.M., De la Villa P., Bosch F., De la Rosa E.J., Cuenca N. Proinsulin slows retinal degeneration and vision loss in the P23H rat model of retinitis pigmentosa. *Hum. gene ther*. 2012; 23(12): 1290-1300.
55. Isiegas C., Marinich-Madzarevich J.A., Marchena M., Ruiz J.M., Cano M.J., De la Villa P., Hernández-Sánchez C., De la Rose E.J., De Pablo F. Intravitreal injection of proinsulin-loaded microspheres delays photoreceptor cell death and vision loss in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2016; 57 (8): 3610-8.
56. Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K., Nakahara T., Hara M., Chan L. Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(8): 2458-63.
57. Fujimiya M., Kojima H., Ichinose M., Arai R., Kimura H., Kashiwagi A., Chan L. Fusion of proinsulin-producing bone marrow-derived cells with hepatocytes in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104(10): 4030-5.
58. Buras E.D., Yang L., Saha P., Kim J., Mehta P., Yang Y., Hilsenbeck S., Kojima H., Chen W., Smith C. W., Chan L. Proinsulin-producing, hyperglycemia-induced adipose tissue macrophages underlie insulin resistance in high fat-fed diabetic mice. *FASEB J*. 2018; 29: 3537-48.
59. Terashima T., Kojima H., Chan L. Bone marrow expression of poly (ADP-ribose) polymerase underlies diabetic neuropathy via hematopoietic-neuronal cells fusion. *FASEB. J*. 2012; 26(1): 295-308.
60. Wilkinson T. N. and Bathgate R. A. The evolution of the relaxin peptide family and their receptors. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2007; 612: 1-13.
61. Alekseev L.P., Dedov I.I., Haitov R.M., Boldyreva M.N., Trofimov D.YU., Peterkova V.A., Kuraeva T.L., Abramov D.D. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus - from fundamental ideas to medical practice. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2012; 67(1): 75-80. (in Russian)
62. Ali M. A., Liu Y-F., Arif S., Tatovic D., Shariff H., Gibson V. B. et al. Metabolic and immune effects of immunotherapy with proinsulin peptide in human new-onset type 1 diabetes. *Sci. Transl. Med*. 2017; 9, eaaf7779.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Овчинников А.Н., Дерюгина А.В.

## РОТОВАЯ ЖИДКОСТЬ КАК ВЫСОКОИНФОРМАТИВНЫЙ СУБСТРАТ НЕИНВАЗИВНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И ПОВРЕЖДЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ У ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ В УСЛОВИЯХ ФИЗИЧЕСКИХ НАГРУЗОК

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», кафедра физиологии и анатомии, 603950, Нижний Новгород, Россия

*Цель: исследовать эффективность измерения показателей окислительного стресса и маркеров повреждения мышечной ткани в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов при физической нагрузке для анализа их функционального состояния. В исследовании приняло участие 70 высококвалифицированных спортсменов мужского пола в возрасте от 16 до 20 лет, специализирующихся в циклических видах спорта (легкая атлетика, плавание). Контрольные упражнения для спортсменов представляли серию отрезков 3×100 метров гладким бегом с отдыхом между ними 45 секунд – для легкоатлетов, и 4×50 метров в ведущим стилем плавания с отдыхом между отрезками 45 секунд – для пловцов. Активность креатинкиназы и содержание продуктов ПОЛ в сыворотке крови и ротовой жидкости измеряли стандартными биохимическими методами. Установлено, что при выполнении контрольных упражнений происходит генерация продуктов липопероксидации, повышается активность креатинкиназы в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов. Проведение корреляционного анализа показало, что интенсивность реакций свободнорадикального окисления липидных субстратов у высококвалифицированных спортсменов можно оценивать по уровням продуктов ПОЛ в ротовой жидкости.*

**Ключевые слова:** ротовая жидкость; продукты ПОЛ; окислительный стресс; креатинкиназа; повреждение мышц; высококвалифицированные спортсмены; физическая нагрузка.

**Для цитирования:** Овчинников А.Н., Дерюгина А.В. Ротовая жидкость как высокоинформативный субстрат неинвазивного исследования процессов липопероксидации и повреждения мышечной ткани у высококвалифицированных спортсменов в условиях физических нагрузок. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (7): 405-408.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-405-408>

*Ovchinnikov A.N., Deryugina A.V.*

### SALIVA AS HIGHLY INFORMATIVE SUBSTRATE FOR NON-INVASIVE ANALYSIS OF LIPOPEROXIDE PROCESSES AND MUSCLE DAMAGE IN HIGHLY SKILLED ATHLETES

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Department of Physiology and Anatomy, 603950, Nizhny Novgorod, Russia

*The purpose of the investigation was to study the efficiency of measuring markers of oxidative stress and muscle damage in the oral fluid in highly skilled sportsmen under physical exercise for the assessment of their functional state. 70 highly qualified athletes at the age of 16-20 years specializing in the cyclic kinds of sports (track and field, swimming) took part in the investigation. Sportsmen performed the control test which consisted of the series of 3×100 m distances by a flat race with an active 45 s rest between them for the track and field athletes, and 4×50 m by the main swimming style with an active rest between the distances also for 45 s for the swimmers. Activity of creatine kinase, content of lipid peroxidation products in the blood and oral fluid were measured standard biochemical methods. The performance of the functional tests induces the excessive accumulation of toxic products of lipoperoxidation and increases activity of creatine kinase in the oral fluid of highly qualified athletes. Correlation analysis shows, that the intensity of free radical and peroxide processes in athletes can be evaluated by means of the method of measuring the content of lipid peroxidation products in the oral fluid.*

**Key words:** saliva; lipid peroxidation; oxidative stress; creatine kinase; muscle damage; highly qualified athletes; physical load.

**For citation:** Овчинников А.Н., Дерюгина А.В. Saliva as highly informative substrate for non-invasive analysis of lipoperoxide processes and muscle damage in highly skilled athletes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (7): 405-408 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-405-408>

**For correspondence:** Овчинников А.Н., PhD student of the Department of Physiology and Anatomy; e-mail: alexander\_ovchinnikov91@mail.ru

#### Information about authors:

Ovchinnikov A.N., <https://orcid.org/0000-0001-7527-3503>.

Deryugina A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8812-8559>.

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

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

Received 20.05.2019  
Accepted 04.07.2019

**Введение.** Доминирующее значение в современных условиях в общем комплексе медико-биологических процедур и инструментального контроля уровня физической подготовленности занимает совершенствование неинвазивных методов оперативной диагностики функционального состояния организма спортсменов. Субстратом биохимических исследований, как правило, является кровь, а также моча, реже – выделения потовых желез и ротовая жидкость [1]. Однако забор крови в условиях учебно-тренировочного процесса предусматривает присутствие квалифицированного персонала и наличие специального оборудования с целью предупреждения риска инфицирования, а также нередко приводит к возникновению состояния психологического дискомфорта у спортсменов. Вместе с тем, при использовании сыворотки крови и мочи в качестве субстратов биохимического скрининга неосуществимо многократное получение проб у спортсменов на разных этапах учебно-тренировочного занятия, в отличие от возможности забора ротовой жидкости. Кроме того следует учитывать требования ВАДА, где к перечню запрещенных отнесены любые формы внутрисосудистых и иных манипуляций с кровью или ее компонентами физическими или химическими методами [2]. Сложившаяся ситуация обуславливает предпочтительность использования ротовой жидкости (смешанной слюны) в качестве информативной биологической среды организма с высокой степенью доступности, специфичности и чувствительности. Известно, что одной из основных функций слюны является поддержание гомеостаза в ротовой полости. В её состав входят органические и неорганические компоненты из слюнных желез, сыворотки крови и тканей полости рта [3]. Оценка буффального эпителия позволяет судить о дестабилизационных процессах на местном и системном уровнях [4]. Кроме того, слюна содержит липиды, которые могут служить субстратом для свободнорадикальных процессов, антиоксидантные ферменты (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы), витамины (А, С, Е), биологически активные вещества, известные как модуляторы реакций свободнорадикального окисления (адреналин, серотонин, гистамин, стероиды и др.) [5]. Вышеуказанное характеризует перспективность изучения биохимических показателей метаболизма в ротовой жидкости квалифицированных спортсменов в условиях выполнения ими физических упражнений для оценки уровня окислительного стресса и степени повреждения мышечной ткани.

Цель работы – исследовать эффективность измерения показателей окислительного стресса и маркеров повреждения мышечной ткани в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов при физической нагрузке для анализа их функционального состояния.

**Материал и методы.** В исследовании приняло участие 70 высококвалифицированных спортсменов мужского пола в возрасте от 16 до 20 лет, специализирующихся в циклических видах спорта (легкая атлетика, плавание). Контрольные упражнения для спортсменов представляли серию отрезков 3×100 метров гладким бегом с отдыхом между ними 45 секунд – для легкоатлетов, и 4×50 метров ведущим стилем плавания с отдыхом между отрезками 45 секунд – для пловцов.

Объектом исследования биохимических показателей выступала кровь и смешанная слюна (ротовая жидкость) спортсменов. Ротовую жидкость собирали в пластиковую микроцентрифужную пробирку без дополнительной стимуляции. Забор образцов крови производился из локтевой вены.

Перед участием в исследовании каждый спортсмен был ознакомлен с его условиями и подписал форму добровольного информированного согласия. Исследование было организовано и проводилось в соответствии с этическими нормами, установленными Хельсинкской декларацией [6].

Уровень первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и конечных продуктов липопероксидации – оснований Шиффа (ОШ) определяли на спектрофотометре «СФ-2000» («ОКБ СПЕКТР», Россия) по методу И.А. Волчегорского [7]. Активность креатинкиназы (КК) в ротовой жидкости оценивали энзиматическим кинетическим методом в диапазоне 1-1100 Ед/л в биохимическом анализаторе «Clima MC-15» («RAL», Испания) с использованием набора реагентов СК-NAС DiaS (Германия).

Статистическая обработка полученных данных выполнена с использованием программных приложений Microsoft Excel 2013, Statistica 12, R. Полученные результаты представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Анализ на предмет определения статистически значимых различий проводили с применением критерия Вилкоксона. С целью установления статистических связей между исследуемыми показателями окислительного стресса в крови и ротовой жидкости проводили корреляционный анализ.

**Результаты и обсуждение.** Преодоление пловцами серии отрезков 4×50 метров ведущим стилем плавания с отдыхом между отрезками 45 секунд приводило к интенсификации реакций свободнорадикального окисления липидных субстратов (табл. 1).

Так, содержание ТК и ОШ в ротовой жидкости пловцов после физической нагрузки было статистически значимо выше на 5,71% и 15,73% в сравнении со значениями преднагрузочного состояния спортсменов. Кроме того, после выполнения функционального теста пловцами, показатель ОШ/(ДК+ТК), характеризующий направленность процессов липопероксидации, статистически значимо увеличился в сторону преобладания ОШ в ротовой жидкости на 12,8% в сравнении с данными преднагрузочного периода.

В условиях преодоления легкоатлетами серии отрезков 3×100 метров гладким бегом с отдыхом между ними 45 секунд также показано статистически значимое увеличение уровня молекулярных продуктов ПОЛ в постнагрузочных образцах ротовой жидкости по сравнению с преднагрузочными данными (табл. 2).

Так, после выполнения контрольного упражнения легкоатлетами содержание ДК, ТК и ОШ в ротовой жидкости было статистически значимо больше на 3,57%, 3,03% и 58,88% соответственно в сравнении со значениями преднагрузочного периода. Вместе с тем, коэффициент ОШ/(ДК+ТК), отражающий направленность процессов свободнорадикального окисления липидных субстратов в сторону накопления наиболее токсичных продуктов липопероксидации – ОШ, достоверно увеличился после физической нагрузки на 52,36%.

В свою очередь активность креатинкиназы в ротовой жидкости спортсменов после физической нагрузки была статистически значимо выше на 51,01% в сравнении с преднагрузочными данными (табл. 3).

При проведении корреляционного анализа установлена тесная прямая статистическая связь между показателями интенсивности свободнорадикального окис-

Таблица 1

**Содержание продуктов перекисного окисления липидов в ротовой жидкости высококвалифицированных пловцов ( $M \pm m$ ),  $n = 40$**

Показатель, ед. измерения	До физической нагрузки	После физической нагрузки
ДК, отн. ед.	0,28±0,001	0,28±0,002
ТК, отн. ед.	0,35±0,004	0,37±0,004*
ОШ, отн. ед.	127,23±3,42	147,24±4,81*
ОШ/(ДК+ТК), отн. ед.	200,75±3,90	226,44±5,61*

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 : \* - статистически значимая разница значений показателя до и после физической нагрузки, тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ .

Таблица 2

**Содержание продуктов перекисного окисления липидов в ротовой жидкости высококвалифицированных легкоатлетов ( $M \pm m$ ),  $n = 30$**

Показатель, ед. измерения	До физической нагрузки	После физической нагрузки
ДК, отн. ед.	0,28±0,003	0,29±0,004*
ТК, отн. ед.	0,33±0,009	0,34±0,008*
ОШ, отн. ед.	89,27±3,59	141,83±7,50*
ОШ/(ДК+ТК), отн. ед.	146,24±3,60	222,81±8,73*

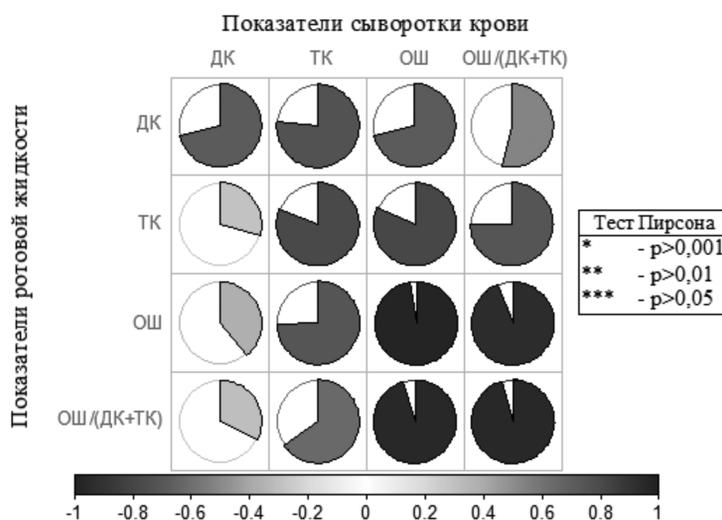
Таблица 3

**Активность креатинкиназы в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов ( $M \pm m$ ),  $n = 30$**

Показатель, ед. измерения	До физической нагрузки	После физической нагрузки
Креатинкиназа, отн. ед.	37,33±2,99	56,37±3,73*

ления липидов в сыворотке крови и смешанной слюне спортсменов в условиях выполнения физических упражнений. Сильная статистическая зависимость установлена между количеством ДК ( $R=0,756$ ) в ротовой жидкости и сыворотке крови, содержанием ТК ( $R=0,809$ ) в смешанной слюне и сыворотке крови (см. рисунок).

Особенно тесная корреляция выявлена между концентрацией ОШ ( $R=0,974$ ) в ротовой жидкости и сыворотке крови спортсменов после выполнения контрольных упражнений. Анализ результатов показал, что выполнение физических упражнений в зоне максимальной физиологической мощности сопровождается развитием окислительного стресса, проявляющегося изменением уровня продуктов липопероксидации не только в крови, но и в ротовой жидкости, что является отражением биохимических сдвигов, которые возникают при физических нагрузках. Известно, что во время мышечных сокращений увеличивается потребление молекулярного кислорода миоцитами, подавляющая часть которого используется электрон-транспортной цепью митохондрий в реакциях окислительного фосфорилирования с образованием молекулы воды [8], а другая часть конвертируется в супероксид анион радикал [9, 10]. При этом потеря электронов ферментными комплексами дыхательной цепи, которая приводит к генерации супероксид анион радикалов, во время сократительной активности мышечного волокна существенно меньше, чем в период расслабления, и составляет менее 0,15% от суммарного потребления кислорода клеткой [8- 12]. Следовательно, можно предположить, что основной вклад в интенсификацию реакций свободнорадикального окисления во время напряженной двигательной деятельности вносят другие метаболические пути [10, 13]. Ключевым источ-



Корреляционная матрица маркеров окислительного стресса в сыворотке крови и ротовой жидкости спортсменов,  $n = 70$ .

ником генерации реакционно-активных форм кислорода (АФК) в поперечно-полосатой мышечной ткани выступают две изоформы НАДФН-оксидазы ( $NOX2$  и  $NOX4$ ), катализирующие превращение внеклеточного молекулярного кислорода в супероксид анион радикал, используя внутриклеточный НАДФН в качестве донора электронов [10, 11, 13]. Другим потенциальным механизмом генерации АФК может являться рост активности ксантинооксидазы, который опосредован накоплением продуктов распада пуринового обмена в условиях гипоксии [10, 13]. При реперфузии ксантинооксидаза катаболизирует гипоксантин до мочевиной кислоты и в сопряженной реакции восстанавливает молекулярный кислород до супероксид анион радикала, который, в свою очередь,

спонтанно дисмутирует в пероксид водорода. Третьим метаболическим путем инициации ПОЛ может служить активация липоксигеназ, катализирующих реакцию диоксигенации полиненасыщенных жирных кислот [10, 11]. Однако следует подчеркнуть, что интенсификация цепных реакций свободнорадикального окисления в организме в норме купируется своевременным функциональным ответом со стороны системы антиоксидантной защиты. Патологические последствия для метаболического фона возникают, прежде всего, в случае неспособности эндогенной антиоксидантной системы обеспечить поддержание прооксидантно-антиоксидантного равновесия в границах физиологического оптимума, что в итоге приводит к катализации свободнорадикальных реакций и генерации токсичных продуктов пероксидации [1]. Последнее сопровождается нарушением структуры и функциональной активности клеток: от изменения проницаемости и барьерной функции мембран до лизиса и апоптоза клетки [14]. Идентификация во внеклеточной среде организма повышенного содержания растворимых мышечных ферментов, в частности креатинкиназы, может указывать на дезорганизацию структуры саркомера, нарушение барьерных свойств сарколеммы, повреждение миоцитов [15].

Таким образом, биохимические сдвиги, возникающие при повышенной двигательной активности, связаны с изменениями направленности метаболизма мышечной ткани, а анализ ротовой жидкости может выступать в качестве надежного атравматичного метода ранней диагностики в системе мониторинга предупреждения перетренированности и дизадаптации организма, обуславливающих снижение физической работоспособности высококвалифицированных спортсменов.

#### Выводы.

1. Выполнение физических упражнений максимальной физиологической мощности с интервалами отдыха стимулирует генерацию продуктов ПОЛ, увеличивает активность креатинкиназы в ротовой жидкости высококвалифицированных спортсменов.

2. Интенсивность процессов окислительной деградации липидных субстратов у спортсменов целесообразно оценивать по уровням продуктов липопероксидации в ротовой жидкости, что позволит оперативно корректировать многоуровневую систему подготовки спортсменов и улучшать их функциональное состояние.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 6, 8-13, 15 см. REFERENCES)

1. Контрощикова К.Н., Тихомирова Ю.Р., Овчинников А.Н., Колегова Т.И., Чуркина Н.Н., Кузнецова С.Ю. и др. Использование показателей свободнорадикального окисления в ротовой жидкости в качестве маркеров функционального состояния спортсменов. *Современные технологии в медицине*. 2017; 3: 82-6.
3. Гильмирова Ф.Н., Радомская В.М., Гергель Н.И. Аналитические подходы к изучению показателей метаболизма в ротовой жидкости. М.: Известия; 2006.
4. Дерюгина А.В., Ивашенко М.Н., Игнатьев П.С., Самоделькин А.Г., Белов А.А., Гушчин В.А. Оценка генотоксичных эффектов в буккальном эпителии при нарушениях адаптационного статуса организма. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(5): 290-2.

5. Фотина И.А. Диагностическая информативность изменений биохимических показателей сыворотки крови и ротовой жидкости при сахарном диабете 2-го типа. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2012; 1: 133-5.
7. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии*. 1989; 35(1): 127-31.
14. Гунина Л.М. Окислительный стресс и адаптация: метаболические аспекты влияния физических нагрузок. *Наука в олимпийском спорте*. 2013; 4: 19-25.

#### REFERENCES

1. Kontorshchikova K.N., Tihomirova Yu.R., Ovchinnikov A.N., Kolegova T.I., Churkina N.N., Kuznetsova S.Y. et al. Indices of Free Radical Oxidation in the Oral Fluid as Markers of Athletes' Functional State. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2017; (3): 82-6. (in Russian)
2. World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code. International Standard. Prohibited List 2019.
3. Gil'miyarova F.N., Radomskaya V.M., Gergel N.I. Analiticheskie podkhody k izucheniyu pokazateley metabolizma v rotovoy zhidkosti [Analytical approaches to the study of metabolism indices in the oral fluid]. Moscow: Izvestiya; 2006. (in Russian)
4. Deriugina A.V., Ivaschenko M.N., Ignatiev P.S., Samodelkin A.G., Belov A.A., Gushchin V.A. The evaluation of genotoxic effects in buccal epithelium under disorders of adaption status of organism. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63(5): 290-2. (in Russian)
5. Fotina I.A. Diagnostic changes informativeness of biochemical indicators of blood serum and the oral liquid at the diabetes mellitus mellitus 2 types. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Severo-Kavkazskiy region. Estestvennye nauki*. 2012; (1): 133-5. (in Russian)
6. World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendation guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *Journal of the American Medical Association*. 1997; 277(11): 925-6.
7. Volchegorskii I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G., Lifshic R.I. Comparison of various approaches to determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1989; 35(1): 127-31. (in Russian)
8. Vasilaki A., Jackson M.J. Role of reactive oxygen species in the defective regeneration seen in aging muscle. *Free radical biology & medicine*. 2013; 65: 317-23.
9. Lamb G.D., Westerblad H. Acute effects of reactive oxygen and nitrogen species on the contractile function of skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 2011; 589: 2119-27.
10. Sakellariou G.K., Jackson M.J., Vasilaki A. Redefining the major contributors to superoxide production in contracting skeletal muscle. The role of NAD(P)H oxidases. *Free radical research*. 2014; 48(1): 12-29.
11. Powers S.K., Ji L.L., Kavazis A.N., Jackson M.J. Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle. *Comprehensive Physiology*. 2011; 1(2): 941-69.
12. Kozakowska M., Pietraszek-Gremplewicz K., Jozkowicz A., Dulak J. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *Journal of muscle research and cell motility*. 2015; 36(6): 377-93.
13. Beckendorf L., Linke W.A. Emerging importance of oxidative stress in regulating striated muscle elasticity. *Journal of muscle research and cell motility*. 2015; 36(1): 25-36.
14. Gunina L.M. Oxidative stress and adaptation: metabolic aspects of physical activity impact. *Nauka v olimpiyskom sporte*. 2013; (4): 19-25. (in Russian)
15. Aoi W., Naito Y., Yoshikawa T. Role of oxidative stress in impaired insulin signaling associated with exercise-induced muscle damage. *Free radical biology & medicine*. 2013; 65: 1265-72.

Поступила 20.05.19

Принята к печати 04.07.19

## ИММУНОЛОГИЯ

© МАРДАНЛЫ С.Г., 2019

Марданлы С.Г.

### К ВОПРОСУ О СТАНДАРТИЗАЦИИ УСЛОВИЙ ПРОИЗВОДСТВА КОМПОНЕНТОВ И ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ НА ПРИМЕРЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА

<sup>1</sup>ЗАО «ЭКОлаб, 142530, г. Электрогорск, Московская обл., Россия;

<sup>2</sup>Государственный гуманитарно-технологический университет «ГГТУ» ГОУВО Московской области, 142611, г. Орехово-Зуево, Россия

*Использование в ряде клинико-диагностических лабораторий (КДЛ) технологии подготовки компонентов для реакции иммунофлюоресценции (РИФ) в соответствии с рекомендациями Методических указаний, введенных приказом Минздрава РФ от 26 марта 2001 г. № 87, не гарантирует необходимой стандартности условий подготовки и проведения РИФ. Последнее достигается использованием в практике работы КДЛ соответствующих наборов реагентов промышленного производства.*

**Ключевые слова:** диагностика сифилиса; реакция иммунофлюоресценции; антиген *Treponema pallidum*.

**Для цитирования:** Марданлы С.Г. К вопросу о стандартизации условий производства компонентов и постановки реакции иммунофлюоресценции на примере лабораторной диагностики сифилиса (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (7): 409-412. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-409-412>

MARDANLY S.G.

STANDARDIZATION OF COMPONENT MANUFACTURING CONDITIONS AND SETTING UP THE IMMUNOFLUORESCENCE REACTION ON THE EXAMPLE OF SYPHILIS LABORATORY DIAGNOSTICS

<sup>1</sup>CJSC EKOLab, 142530, Moscow region, Elektrogorsk city, Russia;

<sup>2</sup>State Educational Institution of Higher Education of the Moscow Region. State University of Humanities and Technology, 142611, Moscow region, Orekhovo-Zuevo, Russia

*The use of technology for preparing components for immunofluorescence reaction (RIF) in a number of clinical diagnostic laboratories (CDL) in accordance with the recommendations of the Guidelines introduced by order of the RF Ministry of Health No 87 dated March 26, 2001 does not guarantee the required standardization of RIF preparation and conduct conditions. The latter is achieved by using the appropriate industrial production reagent kits in the CDL practice.*

**Key words:** syphilis diagnostics; immunofluorescence reaction; *Treponema pallidum* antigen.

**For citation:** Mardanly S.G. Standardization of component manufacturing conditions and setting up the immunofluorescence reaction on the example of syphilis laboratory diagnostics (literature review). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (7):409-412 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-409-412>

**For correspondence:** Mardanly S.G., Doctor of Medical Sciences, R&D Director in CJSC EKOLab, Professor at the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences, State University of Humanities and Technology (Orekhovo-Zuevo); e-mail: [ekolab-president@mail.ru](mailto:ekolab-president@mail.ru)

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

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

Received 17.06.2019  
Accepted 04.07.2019

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ) входит в число методов лабораторной диагностики, рекомендуемых для практического использования приказом МЗ РФ от 26 марта 2001 года № 87 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса»<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Приказ МЗ РФ от 26 марта 2001 г. № 87 «О совершенствовании серологической диагностики сифилиса».

**Для корреспонденции:** Марданлы Сейфадин Гашимович, д-р мед. наук, дир. ЗАО «ЭКОлаб» по науке, проф. каф. фармакологии и фармацевтических дисциплин «ГГТУ»; e-mail: [ekolab-president@mail.ru](mailto:ekolab-president@mail.ru)

Этим приказом введены в действие Методические указания «Постановка отборочных и диагностических тестов на сифилис», в которых среди прочих методик детально описана методика подготовки и постановки РИФ, которой может воспользоваться любая клиническая лаборатория, располагающая необходимыми материально-техническими возможностями. В настоящее время при диагностике сифилиса многие лаборатории, располагающие такими возможностями, ориентируются именно на эту методику, предпочитая самостоятельно готовить все необходимые для постановки РИФ компоненты, хотя на рынке медицинских изделий для *in*

*vitro*-диагностики уже не один год представлены отечественные наборы реагентов для указанных исследований (см, например, «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG» производства ЗАО «ЭКОлаб», РУ № РЗН 2013/247 или «ЛюмиБест антипаллидум, комплекты 1 и 2» производства АО «Вектор-Бест», РУ № ФСР 2012/13695).

Целесообразно сопоставить технологичность обоих вариантов решения задачи обследования пациентов на сифилис с помощью РИФ.

Методика постановки РИФ и учёта её результатов в этих вариантах, т.е. с использованием, как компонентов собственного изготовления, так и коммерческого набора идентична. На препарат, содержащий *Treponema pallidum*, наносится исследуемая сыворотка, предварительно обработанная сорбентом неспецифических антител, после соответствующей экспозиции, промывания фосфатным буферным раствором и подсушивания на препарат наносится меченная люминофором сыворотка животных, иммунизированных сывороточным белком человека, и после очередной экспозиции, промывания и подсушивания препарата регистрируются результаты реакции. Препарат просматривается под люминесцентным микроскопом и регистрируется наличие и интенсивность флюоресценции *Treponema pallidum*.

Принципиальных отличий в технологии постановки РИФ здесь нет, и быть не может, поскольку любой набор реагентов, предназначенный диагностики сифилиса с помощью РИФ, должен обеспечивать воспроизведение указанной методики постановки и учёта реакции.

Совершенно иная картина при сопоставлении технологии подготовки к проведению исследования.

Следует отметить значительные различия в необходимом материально-техническом обеспечении.

Согласно приказу № 87 в материально-техническом обеспечении РИФ названы только люминесцентный микроскоп с ртутно-кварцевой лампой ДРШ-250, термостат и инактиватор, реальные потребности лаборатории, в которой самостоятельно готовится всё необходимое для постановки РИФ, значительно шире.

В их число, помимо стандартного оборудования клинических лабораторий, в которых исследуются образцы крови (сыворотки), необходимо включить:

1. Оборудование бактериологической лаборатории, позволяющее работать с живыми *Treponema pallidum* (т.е. с микроорганизмами 3 группы патогенности) и материалами, инфицированными ими.

2. Виварий для содержания интактных и заражённых *Treponema pallidum* кроликов.

В соответствии с приказом № 87, в лаборатории готовится антиген – взвесь патогенных *Treponema pallidum* штамма Никольса из 7-9-суточного орхита кролика, которая хранится до использования при 4° С 2-4 мес. Кроме антигена, указаны такие необходимые для постановки РИФ компоненты, как сорбент (разрушенная ультразвуком взвесь смеси культуральных *Treponema pallidum* штаммов V, VII, VIII, IX и Рейтера для удаления из исследуемого образца неспецифических антител) и антивидовая люминесцирующая сыворотка (меченая флюорохромом сыворотка крови животных, иммунизированных сывороточным белком человека), контроли – резкоположительный контроль, слабоположительный контроль и неспецифический контроль; поскольку методика их приготовления в документе не описана, могут, очевидно, использоваться соответствующие коммерческие препараты.

Подготовка к исследованию, включает инактивацию исследуемых образцов (30 мин при 56° С), если кровь берётся непосредственно перед исследованием, обязательное титрование каждой новой серии сорбента и люминесцирующей сыворотки для определения их разведений, обеспечивающих максимальную чувствительность и специфичность реакции.

Непосредственно перед постановкой из антигена готовят препараты-мазки на тонких, хорошо обезжиренных предметных стеклах, на обратной стороне которых стеклорезом обозначены кружки диаметром 0,7 см (по 10 кружков на 1 предметном стекле). В пределах каждого кружка на стекло наносят антиген, распределяя его в пределах каждого кружка запаянным концом пастеровской пипетки, высушивают стекла на воздухе и фиксируют препараты 10 мин в химически чистом ацетоне.

При использовании готовых (коммерческих) наборов реагентов для РИФ не требуется ни бактериологическая лаборатория, ни виварий. В набор входят стекла с уже готовыми препаратами-мазками, приготовленными из стандартизованной взвеси *Treponema pallidum*, предварительно оттитрованные сорбент неспецифических антител и люминесцирующая сыворотка, т.е. при этом не нужны все указанные выше подготовительные операции.

С этой точки зрения, использование готовых наборов, т.е. второго варианта решения задачи и технологичней и экономически целесообразней.

Преимущества этим не исчерпываются.

В соответствии с приказом № 87 результат РИФ (интенсивность флюоресценции *Treponema pallidum*) учитывают по 5-балльной системе: «-», «+», «2+», «3+», «4+», т.е., используя ранговый (или, как сейчас принято его именовать, полуколичественный) показатель. То, что его значение отражает концентрацию антител в образце, общепризнано, но столь же общепризнана значительная вариабельность результатов, прямо связанная с условиями постановки реакции и учёта её результатов. Интенсивность флюоресценции принято считать ориентировочной оценкой содержания антител. По нашему мнению, эта «ориентировочность» связана исключительно с нестандартностью условий постановки РИФ и бесприборной («на глаз») оценкой результатов. Специальные исследования корреляции показателей интенсивности свечения с содержанием специфических антител, выполненные при разработке соответствующей тест-системы для диагностики токсоплазмоза, показали, что минимизация влияния случайных факторов на результат РИФ за счёт использования средних по группам исследованных образцов показателей интенсивности свечения *Toxoplasma gondii* обеспечивает коэффициент их корреляции с содержанием специфических антител по данным ИФА, равный 0,94, т.е. почти функциональную связь этих показателей [2].

Исходя из алгоритма подготовки к РИФ, в вариабельность её результатов основной вклад вносит вариабельность её компонентов, прежде всего, трепонемного антигена, т.е. препаратов-мазков, приготовленных из суспензии *Treponema pallidum*.

Приготовление антигена непосредственно в лабораториях – неизбежная внутрисерийная, межсерийная<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Внутрисерийная вариация есть следствие неодномоментного использования одной и той же серии суспензии *Treponema pallidum* для изготовления препаратов-мазков, а неизбежность межсерийной вариации следует из срока годности суспензии *Treponema pallidum* – 2-4 мес.

и межлабораторная вариация качества этого реагента. При использовании несколькими лабораториями одной и той же серии набора реагентов промышленного изготовления речь может идти о вариации только между препаратами-мазками, приготовленными в одном технологическом цикле, которая всегда будет меньше внутри-серийной вариации препаратов-мазков, приготовленных в лаборатории в нескольких технологических циклах.

Есть очевидные различия и в технологиях приготовления антигена *Treponema pallidum*, рекомендованной приказом № 87, и используемой в промышленном производстве этого реагента (табл. 1).

Несложно убедиться, что стандартность основного специфического компонента РИФ при его промышленном производстве неизбежно должна быть выше стандартности этого реагента при изготовлении непосред-

ственно в лаборатории. Если учесть, что в последнем случае и все прочие специфические компоненты реакции, как коммерческие, так и лабораторного приготовления, предварительно титруются с использованием антигена, их стандартность всегда будет ниже стандартности тех же компонентов, входящих в любую серию наборов промышленного изготовления.

Способом существенного повышения диагностической эффективности РИФ как метода исследования может быть переход на использование в практической деятельности всех КЛД только готовых наборов реагентов.

Кроме вариабельности компонентов реакции «ориентировочность» результатов РИФ обусловлена способом их учёта, т.е. оценкой интенсивности свечения *Treponema pallidum* (в случае диагностики сифилиса) в поле зрения микроскопа «на глаз». Путём превращения иммунофлюо-

Таблица 1.

Технологии приготовления антигена *Treponema pallidum*

Технология, рекомендованная Методическими указаниями Минздрава РФ приказом № 87	Технология, используемая при производстве «Антипаллидум-Флюороген-IgM/IgG» (ЗАО «ЭКОлаб»)
Через 7-9 сут после заражения кроликов в асептических условиях выделяют яички, разрезают их на 10-14 частей, заливают каждое 5 мл среды ЦКВИ или изотонического раствора хлорида натрия, каплю полученной взвеси наносят пастеровской пипеткой на предметное стекло и исследуют в микроскопе с конденсором тёмного поля на наличие <i>Treponema pallidum</i> . При их наличии взвесь переносят во флакон с 50 мл среды ЦКВИ или изотонического раствора хлорида натрия и встряхивают на шейкере, время встряхивания зависит от числа трепонем, обнаруженных при микроскопии – при наличии 5-10 трепонем в поле зрения встряхивание длится 1 ч при наличии 30-40 – 20-30 мин. После встряхивания содержимое флакона центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин, в надсадочной жидкости с помощью тёмнопольной микроскопии определяют концентрацию трепонем. Для приготовления препаратов антигена (препаратов-мазков) для постановки РИФ необходима взвесь, содержащая 40-60 трепонем в поле зрения микроскопа. Перед каждой постановкой необходимо определять наличие во взвеси спонтанной агглютинации трепонем и их количество.	Через 7-10 сут. после заражения кроликов в асептических условиях выделяют яички. Каждое выделенное яичко измельчают ножницами до кашицеобразного состояния, заливают 5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия, встряхивают на орбитальной шейкере 25 мин при 250 об/мин, полученную взвесь центрифугируют по 5 мин при 1000 об/мин, сливают надсадочную жидкость и выполняют эту процедуру ещё 2 раза, в полученном центрифугате (взвесь <i>Treponema pallidum</i> ) контролируют степень очистки от фрагментов клеток яичка, при необходимости проводят дополнительное центрифугирование в тех же условиях, вновь контролируют чистоту суспензии и при необходимости центрифугируют её 5-6 мин при 1250 об/мин. Очищенную взвесь центрифугируют 30 мин. при 8000 об/мин для осаждения трепонем, сливают центрифугат и ресуспендируют осадок в фосфатном буферном растворе в объёме в 2-3 раза меньшем исходного объёма взвеси трепонем. В полученной суспензии (антиген <i>Treponema pallidum</i> ) определяется концентрация трепонем, для чего готовят 1,000 мл взвеси, разведённой изотоническим раствором хлорида натрия 1:100 (10 мкл взвеси + 990 мкл изотонического раствора хлорида натрия), 5 мкл этого разведения наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом (18x18 мм) и с помощью тёмнопольной микроскопии определяют состояние трепонем (в поле зрения должны наблюдаться хорошо подвижные, с ненарушенной морфологией <i>Treponema pallidum</i> ) и их содержание во взвеси – подсчёт их числа в поле зрения (среднее по 10 полям зрения) и пересчёт на 1 мл, исходя из известной площади поля зрения, известной площади покровного стекла и известного объёма жидкости, находящегося под покровным стеклом (рис. 1)



\* число полей зрения = площадь покровного стекла, мм<sup>2</sup>/площадь поля зрения, мм<sup>2</sup>

Рис. 1. Формула для подсчета количества *Treponema pallidum* в 1 мл.

ресцентного метода диагностики в современный способ диагностического исследования является автоматизация регистрации и учёта результатов РИФ с использованием средств видеодигитальной регистрации (ВЦР) с последующим компьютерным анализом полученных данных. Такое оборудование существует, но только в импортном варианте [3], хотя до недавнего времени существовала надежда на успешное решение этой задачи коллективом специалистов под руководством Ю. Ю. Венгерова, т.е. на появление соответствующей отечественной системы. Смерть руководителя привела к распаду коллектива, так что остается только надеяться, что научное руководство Института биохимии им. А. Н. Баха РАН всё же не даст окончательно заглухнуть этому крайне перспективному направлению, позволяющему объективизировать и автоматизировать регистрацию и учёт результатов практически любых серологических исследований, основным недостатком которых как раз и является субъективность оценок соответствующих реакций.

Проведённый сравнительный анализ технологичности двух вариантов организации лабораторного исследования на сифилис с использованием РИФ позволяет сделать заключение о преимуществах использования в КЛД соответствующих коммерческих тест-систем и о целесообразности отказа от приготовления основных компонентов, необходимых для этого исследования, в лабораторных условиях. Нужны лишь определённые административные решения на уровне Минздрава РФ. Для превращения иммунофлюоресцентного анализа в современный метод исследования явно не хватает завер-

шения работ по внедрению метода ВЦР и в этой области серодиагностики. Для завершения нужны не только благие пожелания, но и вполне конкретные решения о включении соответствующих разработок в общую программу создания производств отечественной аналитической техники для нужд клинической лабораторной диагностики.

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

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

---

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Марданлы С.Г. Эпидемиологический надзор за инфекциями TORCH-группы на основе современных технологий лабораторной диагностики. Дисс. д-ра мед.наук. Москва; 2016.
2. Computer-Supported Immunofluorescence Microscope by EUROIMMUN with Basler ace and Basler dart Cameras, <https://www.baslerweb.com/en/>.

---

#### REFERENCES

1. Mardany S.G. Epidemiological surveillance of TORCH infections based on modern laboratory diagnostic technologies. Diss. ... Moscow; 2016. (in Russian)
2. Computer-Supported Immunofluorescence Microscope by EUROIMMUN with Basler ace and Basler dart Cameras, <https://www.baslerweb.com/en/>.

Поступила 17.06.19

Принята к печати 04.07.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Янушевич О.О.<sup>1</sup>, Духовская Н.Е.<sup>1</sup>, Островская И.Г.<sup>1</sup>, Вавилова Т.П.<sup>1</sup>, Ахмедов Г.Д.<sup>1</sup>,  
Новикова Т.М.<sup>2</sup>, Шашковская В.С.<sup>2</sup>, Спиридонова В.А.<sup>2</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВА ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 МЕТОДАМИ SDS-ПААГ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА И ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА В СМЕШАННОЙ СЛЮНЕ ПОСЛЕ ОПОЛАСКИВАНИЯ ПОЛОСТИ РТА РАСТВОРОМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА, СПЕЦИФИЧЕСКОГО К ИНТЕРЛЕЙКИНУ-6

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, 127473, Москва, Россия;

<sup>2</sup>НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Россия

*Были изучены селективные свойства раствора олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6 на концентрацию ИЛ-6 в смешанной слюне пациентов с воспалительными процессами в ротовой полости методами SDS-ПААГ электрофореза и иммуноферментного анализа. Применение данных методов показало, что в смешанной слюне пациентов после полоскания раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, снижается количество ИЛ-6. Наибольшую чувствительность для определения концентрации ИЛ-6 в слюне показал метод ELISA Kit и 20% SDS-ПААГ при окрашивании серебром, что необходимо учитывать в клинической лабораторной практике.*

**Ключевые слова:** раствор олигонуклеотида; специфический к интерлейкину-6; смешанная слюна; электрофорез; иммуноферментный анализ.

**Для цитирования:** Янушевич О.О., Духовская Н.Е., Островская И.Г., Вавилова Т.П., Ахмедов Г.Д., Новикова Т.М., Шашковская В.С., Спиридонова В.А. Исследование количества интерлейкина -6 методами SDS-ПААГ электрофореза и иммуноферментного анализа в смешанной слюне после ополаскивания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к интерлейкину -6. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64 (7): 413-416.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-413-416>

Yanushevish O.O.<sup>1</sup>, Dukhovskaya N.E.<sup>1</sup>, Ostrovskaya I.G.<sup>1</sup>, Vavilova T.P.<sup>1</sup>, Akhmedov G.D.<sup>1</sup>, Novikova T.M.<sup>2</sup>,  
Shashkovskaya V.S.<sup>2</sup>, Spiridonova V.A.<sup>2</sup>

STUDY OF THE QUANTITY OF INTERLEUKIN-6 BY SDS-PAAG ELECTROPHORESIS AND IMMUNO-ENZYME ANALYSIS IN MIXED SALIVA AFTER RINSING THE ORAL CAVITY WITH OLIGONUCLEOTIDE SPECIFIC BY INTERLEUKIN-6

<sup>1</sup>Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, 127473, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>The A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992, Moscow, Russia

*The selective properties of a solution of oligonucleotide specific to IL-6 on the concentration of IL-6 in mixed saliva of patients with oral inflammatory processes were studied using SDS-PAGE by electrophoresis and enzyme immunoassay. The application of these methods showed that in the mixed saliva of patients after rinsing with a solution of an oligonucleotide specific for IL-6, the amount of IL-6 decreases. The ELISA Kit and 20% SDS-PAGE showed the highest sensitivity to determine the concentration of IL-6 in saliva, which should be considered in clinical laboratory practice.*

**Key words:** oligonucleotide solution specific to interleukin-6; mixed saliva; electrophoresis; enzyme immunoassay analysis.

**For citation:** Yanushevish O.O., Dukhovskaya N.E., Ostrovskaya I.G., Vavilova T.P., Akhmedov G.D., Novikova T.M., Shashkovskaya V.S., Spiridonova V.A. Study of the quantity of interleukin-6 by SDS-PAAG electrophoresis and immuno-enzyme analysis in mixed saliva after rinsing the oral cavity with oligonucleotide specific. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (7): 413-416 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-413-416>

**For correspondence:** Dukhovskaya N.E., Ph.D. Sci. Med., Associate Professor at the Department propaedeutics of dental diseases; e-mail: [ndukhovskay@mail.ru](mailto:ndukhovskay@mail.ru)

### Information about authors:

Dukhovskaya N.E., <https://orcid.org/0000-0003-0533-7051>

Ostrovskaya I.G., <https://orcid.org/0000-0001-6788-4945>

Vavilova T.P., <https://orcid.org/0000-0002-4255-8825>

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

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

Received 23.05.2019  
Accepted 31.05.2019

**Для корреспонденции:** Духовская Наталья Евгеньевна, канд. мед. наук, доц. каф. пропедевтики стоматологических заболеваний; e-mail: [ndukhovskay@mail.ru](mailto:ndukhovskay@mail.ru)

**Введение.** В стоматологической практике существует множество форм заболеваний тканей ротовой полости, сопровождающихся воспалительными процессами. Воспалительным изменениям сопутствует реакция иммунокомпетентных клеток, которые секретируют множество цитокинов и других белков, участвующих

в этом процессе. При воспалении идет последовательная секреция фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), интерлейкина (ИЛ)-1 и -6. Под действием этих цитокинов активируется продукция печенью белков острой фазы воспаления и стимулируется гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система, что способствует регуляции воспалительного процесса [1-5].

Интерлейкин-6 является плейотропным цитокином с молекулярной массой 19–24 кДа, вырабатывается не только клетками иммунной системы, но и вспомогательными клетками, обладающими иммунной функцией (моноцитами, макрофагами, лимфоцитами, эндотелиоцитами, астроцитами и клетками микроглии). Своё действие ИЛ-6 реализует через систему JAK-STAT, состоящую из янус-киназы (JAK), а также из сигнального белка-транскриптора и активатора транскрипции (STAT) [6]. Спектр биологического действия ИЛ-6 достаточно широк и реализуется в основном в обеспечении дифференцировки клеток-мишеней на поздних стадиях развития, а также он участвует в дифференцировке цитотоксических Т-лимфоцитов [7].

Терапевтические ингибиторы ИЛ-6 или его рецептора уже используются для лечения некоторых аутоиммунных заболеваний, однако имеется опасность, что системная блокировка может подавить защитные функции этого цитокина. Предполагается, что в будущем на смену системной терапии придут более специфические подходы, учитывающие особенности молекулярных сигнальных механизмов в клетках-мишенях и различия в функции ИЛ-6 в зависимости от типов клеток, его продуцирующих [8].

Сегодня одновременно ведется множество исследований, рассматривающих различные способы применения наночастиц, содержащих селективные ингибиторы, что является подходящим решением для лечения многих заболеваний. Использование наночастиц, содержащих активные вещества, может значительно повлиять на профилактику и успешное лечение воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области в целом. На основании вышеизложенного, разработка методов ингибирования ИЛ-6 с помощью специфического к нему олигонуклеотида, является актуальным и перспективным для решения задач профилактики и возможной коррекции воспалительных процессов в ротовой полости.

*Цель исследования:* разработать и обосновать методику применения раствора олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, у пациентов с воспалительными изменениями в тканях ротовой полости.

*Материал и методы.* В исследовании участвовали 30 пациентов с психотическими расстройствами (средний возраст  $55,2 \pm 1,44$  лет), находящихся на лечении в психиатрическом стационаре ГБУЗ МО ЦКПБ. В план клинического обследования были включены опрос, сбор анамнеза, осмотр полости рта. У данных пациентов в силу их психического состояния невозможно использование инструментальных методов обследования и лечения тканей полости рта. Поэтому было проведено неинвазивное исследование смешанной слюны, в которой определяли количество маркера воспаления, в частности ИЛ-6.

Для получения молекул фрагментов нуклеиновых кислот, специфических к ИЛ-6 был применен метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) с использованием комбинаторной библиотеки нуклеиновых кислот. В основе метода лежит отбор

молекул нуклеиновых кислот, которые обладают каким-либо сродством к белковой мишени. Описание методики селективного фрагментирования ДНК к ИЛ-6 приводится в статье [9].

Раствор олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, получали растворением 0,12 мг лиофилизата в 1000 мл воды, что соответствовало  $0,12 \cdot 10^{-3}\%$ . Полоскание раствором объемом 2 мл проводилось однократно в течение 10 мин, через 10 мин после процедуры осуществлялся сбор смешанной слюны. Образцы слюны получали путём сплевывания без стимуляции в стерильную пластиковую градуированную пробирку в течение 5 мин до и после полоскания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. Для сравнения были изучены образцы смешанной слюны у 13 здоровых волонтеров (средний возраст  $42,7 \pm 1,33$  лет), без воспалительных изменений в ротовой полости.

Для подготовки образцов слюны к исследованию было проведено их центрифугирование при 15000 об/мин в течение 10 мин с получением надосадочной жидкости объемом от 0,1 до 0,5 мл.

При определении белков в смешанной слюне был применён метод SDS-ПААГ электрофореза. Аликвоты всех рабочих образцов были охарактеризованы электрофорезом в 8% и 20% ПААГ в присутствии SDS (додецилсульфата натрия). Вертикальный белковый электрофорез по Лэммли [Laemmli VK, 1970, Nature, 227, 680-685] в денатурирующих условиях проводили в камере Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad) по протоколу [Edited by Bollag D.M., Rozycki M.D., Edelman S.J. (1996) *Prot. Methods* (second edition), pp.107-155]. Разделяющий буфер (12 мл) – 14,6 % акриламида, 0,4 % N, N-метилен-бисакриламида; концентрирующий (4 мл) – 3,8 % акриламида, 0,2 % N, N'-метилен-бисакриламида. Для полимеризации к концентрирующему буферу добавляли 50 и 5, к разделяющему – 80 и 10 мкл 10 % персульфата аммония и TEMED'a, соответственно. В качестве контроля использовали белковые маркеры и стандартные белки: лизоцим (13кДа), химотрипсин А (24кДа). Электрофорез проводили при 15-30 мА. После электрофореза гель окрашивали кумасси по протоколу.

Для вертикального электрофореза в 8% ПААГ смешивали 7,73 г акриламида с 0,27 г N, N-метилен-бисакриламида в присутствии трис-боратного буфера (растворяли 118 г триса, 55 г борной кислоты в 1 л воды). Для полимеризации добавляли 300 мкл раствора 10% персульфата аммония и 20 мкл TEMED. Префорез проводили 45 минут при 15 мА при 4°C. Образцы наносили в растворе 15% глицерина. Электрофорез осуществляли 1,5 часа при 15 мА при 4°C. Гель фиксировали 10% раствором уксусной кислоты с добавлением 20% этанола (в течение ночи), а далее использовали окрашивание серебром с применением трех растворов: 1) тиосульфат натрия (0,3 г/л); 2) нитрат серебра (1г/л) и 37% водный р-р формальдегида (1мл/л); 3) карбонат натрия (40 г/л); тиосульфат натрия (0,003 г/л); 37% водный р-р формальдегида (1мл/л). Все полученные значения оценивали по свидетелю.

Определение активного ИЛ-6 в образцах смешанной слюны пациентов проводилось методом ИФА с использованием набора ELISA Human IL-6 ELISA Kit (Invitrogen) и ИЛ-6 (ЗАО Вектор-Бест, Россия). Полученные результаты были обработаны методами вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Достоверными считались значения при  $p < 0,05$ .

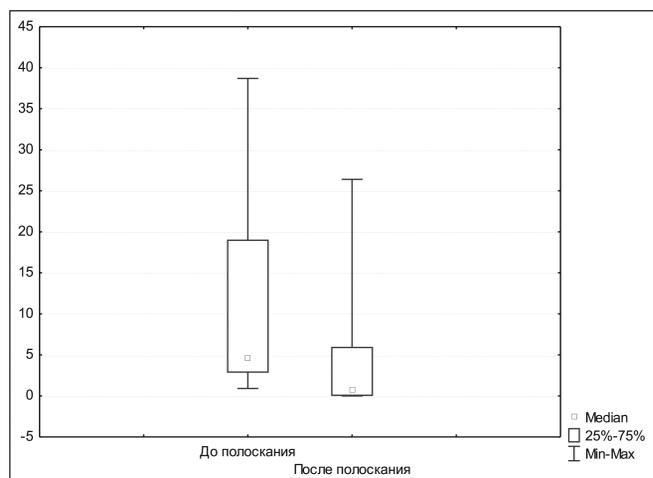


Рис.4. График изменения количества ИЛ-6 (пг/мл) в смешанной слюне пациентов ( $n=16$ ) до и после полоскания раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, определяемого методом ИФА чувствительностью  $<2,0$  пг/мл.

**Результаты и обсуждение.** На электрофореграмме (рис.1, см.обложку) были четко отмечены различия между рабочими образцами ( $n=6$ ), полученными у пациентов до и после полоскания раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. Это позволило сделать первичный вывод, что полоскание раствором вносит изменение в белковый состав слюны. Все контрольные образцы волонтеров имели близкий белковый состав, мало отличающийся между собой.

Так как SDS-ПААГ электрофорез имеет порог чувствительности при определении белков -  $0,5$  мкг/в пробе было принято решение провести характеристику рабочих образцов ( $n=8$ ) в ПААГ в неденатурирующих условиях с использованием для окрашивания белковых полос ионами серебра (рис.2, 3, см.обложку).

Во всех образцах присутствует ИЛ-6 в разных количествах. Было проведено сравнение с рекомбинантным образцом ИЛ-6, который получают в лабораторных условиях. На рис. 2 и 3 показано, что образцы «до» и «после полоскания» раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6 резко отличаются количеством белка: наблюдается снижение белковой составляющей в образце «после полоскания».

Таким образом, визуальное сравнение электрофореграмм подтверждает, что полоскание раствором, олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6 снижает содержание белка в смешанной слюне у пациентов и не влияет на его количество в смешанной слюне здоровых волонтеров.

Было проведено изучение количества ИЛ-6 в смешанной слюне пациентов ( $n=24$ ) до и после полоскания раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. В первом случае был применен метод ИФА с использованием реактива, содержащего антитела к ИЛ-6 (ЗАО Вектор-Бест, Россия) с чувствительностью  $<2,0$  пг/мл.

Полученные результаты выявили достоверные значения ( $p<0,001$ ) в изменении концентрации ИЛ-6 в слюне пациентов до и после полоскания (рис. 4). После по-

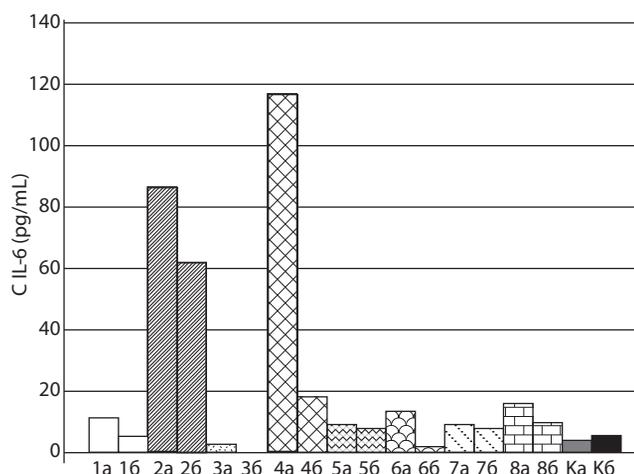


Рис. 5. График изменения количества ИЛ-6 (пг/мл) в индивидуальных образцах смешанной слюны пациентов ( $n=8$ ) до и после полоскания раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. Примечание: 1-8 – пациенты с воспалительными изменениями в ротовой полости; К – контроль (здоровые волонтеры); «а» – до полоскания, «б» – после полоскания.

лоскания раствором из 16 пациентов у 5 человек в смешанной слюне не определялся ИЛ-6, чем и объясняется большая ошибка полученных значений. В слюне здоровых волонтеров этим методом не определялась концентрация ИЛ-6.

В связи с этим, была предпринята попытка использовать другой метод определения ИЛ-6. Диагностическая панель ELISA Human IL-6 определяет количество ИЛ-6 в образце с чувствительностью  $<1,0$  пг/мл. Данным методом определяется как естественный, так и специфический ИЛ-6. Результаты исследования представлены на рисунке 5.

Анализ индивидуальных образцов ( $n=9$ ) смешанной слюны как пациентов, так и здоровых волонтеров с применением метода ELISA показал присутствие ИЛ-6. После полоскания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, наблюдалось снижение уровня ИЛ-6 в слюне.

**Заключение.** Нами получены данные о содержании ИЛ-6 в образцах смешанной слюны пациентов с воспалительными процессами в тканях полости рта до и после полоскания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. Использовались разные методы в исследовании уровня ИЛ-6 в образцах смешанной слюны. Несмотря на то, что оба метода позволили выявить тенденцию к снижению количества ИЛ-6 в образцах смешанной слюны после полоскания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6. Однако, более чувствительным для определения концентрации ИЛ-6 в слюне оказался метод ELISA Kit. Метод электрофореза в 20% ПААГ в неденатурирующих условиях с использованием ионов серебра повышает чувствительность метода, характеризуется простотой исследования и может быть использован в клинической лабораторной практике. Предлагаемая нами методика ополаскивания полости рта раствором олигонуклеотида, специфического к ИЛ-6, может влиять на регуляцию действия ИЛ-6 в ротовой полости.

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

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

---

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-7 см. REFERENCES)

8. Друзкая М.С., Носенко М.А., К-СН Атретханы, Ефимов Г.А., Недоспасов С.А. Интерлейкин-6 - от молекулярных механизмов передачи сигнала к физиологическим функциям и терапевтическим мишеням. *Молекулярная биология*. 2015; 49 ( 6 ); 937–43.
9. Спиридонова В.А., Новикова Т.М., Снигирев О.В. Получение ДНК-аптамеров к интерлейкину-6 человека для создания наносенсорной биомангнитной системы безразделительного иммунного анализа. *Вестник Московского Университета. Серия 3. ФИЗИКА. АСТРОНОМИЯ*. 2016; 1: 113-6.

---

REFERENCES

1. Hesse D.G., Tracey K.J., Fong Y., Manogue K.R., Palladino M.A. Jr., Cerami A., et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1988; 166(2): 147-53.
2. Van Deventer S.J., Buller H.R., ten Gate J.W., Aarden L.A., Hack C.E., Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood*. 1990; 76(12): 2520-6.

3. Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S.C., Dinarello C.A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 1990; 75(1): 40-7.
4. Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem.* 1990; 265(3): 621-36.
5. Lyson K., McCann S.M. The effect of interleukin-6 on pituitary hormone release in vivo and in vitro *Neuroendocrinology*. 1991; 54(3): 262-6.
6. Kishimoto T., Akira S., Narazaki M., Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp 130. *Blood*. 1995; 86(4): 1243-54.
7. Baumann H., Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today*. 1994; 15(2): 74-80.
8. Drutskaya M.S., Nosenko M. And., K-CH. Atratkhany, Efimov G.A., Nedospasov S.A. Interleukin-6 - from molecular mechanisms of signal transmission to physiological functions and therapeutic targets. *Molekulyarnaya biologiya*. 2015; 49(6): 937–43. (in Russian)
9. Spiridonova V.A., Novikova T.M., Snigirev O.V. Receiving DNK-aptamerov to interleukin-6 of the person for creation of a nanosensor biomagnetic system of the bezrazdelitely immune analysis. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Series 3. PHYSICA. ASTRONOMIA*. 2016; 1: 113-6. (in Russian)

Поступила 23.05.19  
Принята к печати 31.05.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Петелина Т.И., Авдеева К.С., Быкова С.Г., Мусихина Н.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А.,  
Зуева Е.В., Леонович С.В., Лысцова Н.Л.

## НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ИММУННОГО ОТВЕТА КАК ЗВЕНО В ПАТОГЕНЕЗЕ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ И ДЕСТРУКЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ У ЖЕНЩИН С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

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

*В последнее время все чаще стали обращать внимание на общность иммуно-воспалительного сосудистого ответа и гормонального профиля в патогенетических механизмах изменения эластических свойств артерий и явлений деструктивных костных изменений, что на субклиническом уровне имеет большое значение для профилактики развития социально-значимых заболеваний. Обследовано 104 пациентки (средний возраст 57,45 лет.), которые были разделены на три группы. В 1 группу вошли 39 здоровых женщин, во 2 группу – 30 пациенток с АГ и остеопенией и в 3 группу – 35 женщин с АГ и остеопорозом. Проводился анализ маркеров иммунного воспалительного ответа, параметров гормонального и минерально-витаминного статуса на фоне исследования параметров суточного мониторинга артериального давления, жесткости сосудистой стенки и денситометрии с целью уточнения предикторов сердечно-сосудистых и дегенеративных костных изменений у женщин в постменопаузе.*

*Зарегистрировано достоверное превышение концентрации вч-СРБ, уровня гомоцистеина, ИЛ-8, паратиреоидного гормона, на фоне достоверного снижения уровня эстрогенов, прогестерона, тестостерона, с наличием стойкой тенденции к повышению уровня общего холестерина, атерогенных фракций липидов, миелопероксидазы, эндотелина-1 и снижению показателей кальция, при достоверно минимальном значении витамина Д в 3-й группе пациенток. Методом логистической регрессии для группы АГ с остеопенией и остеопорозом были рассчитаны риски развития и прогрессирования костных деструктивных изменений. Так, для пациенток с АГ и остеопенией достоверно значимым параметром, ассоциированным с риском развития остеопороза явился показатель скорости пульсовой волны, повышение уровня которого более 12,05 м/с ассоциируется с повышением риска развития остеопороза в 3,8 раз. В усугублении степени имеющейся деструкции костной ткани играют наиболее активное участие повышенные уровни – ИЛ 6 и 8, ФНО-α, вч-СРБ, паратгормона и сниженные уровни прогестерона и ИЛ10. Своевременное специализированное разнонаправленное исследование биохимических и инструментальных параметров (в частности, скорости пульсовой волны и денситометрии) может стать базой для разработки персонализированной тактики профилактики и терапии женщин, с целью предотвращения социально опасных сердечно-сосудистых и костных осложнений.*

**Ключевые слова:** артериальная гипертония; постменопауза; остеопороз; маркеры иммунной воспалительной реакции; гормональный и минерально – витаминный статус.

**Для цитирования:** Петелина Т.И., Авдеева К.С., Быкова С.Г., Мусихина Н.А., Гапон Л.И., Горбатенко Е.А., Зуева Е.В., Леонович С.В., Лысцова Н.Л. Неспецифические параметры иммунного воспалительного ответа как звено в патогенезе ремоделирования сосудистой стенки и деструкции костной ткани у женщин с артериальной гипертензией в постменопаузе. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (7): 417-423. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-417-423>

*Petelina T.I., Avdeeva K.S., Bykova S.G., Musikhina N.A., Gapon L.I., Gorbatenko E.A., Zueva E.V., Leonovich S.V., Lystsova N.L.*

### NON-SPECIFIC PARAMETERS OF IMMUNE RESPONSE AS A LINK IN THE PATHOGENESIS OF REMODELING OF THE VASCULAR WALL AND DESTRUCTION OF BONE TISSUE IN WOMEN WITH ARTERIAL HYPERTENSION IN POSTMENAPUS

Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center RAS, Tomsk, Russia

*Recently, they increasingly began to pay attention to the role of a nonspecific immune-inflammatory vascular response as a link in general pathogenetic mechanisms with a change in the elastic properties of arteries and phenomena of destructive bone changes, which at the subclinical level is of great importance for the prevention of the development of socially significant diseases. A total of 104 patients were examined (mean age 57.45 years), which were divided into three groups. The first group included 39 healthy women, the second group included 30 patients with hypertension and osteopenia, and the third group included 35 women with hypertension and osteoporosis. The analysis of markers of the immune inflammatory response, endothelial dysfunction, hormonal and mineral-vitamin status parameters was conducted against the background of the study of parameters of daily monitoring of arterial pressure, study of parameters of vascular wall stiffness and densitometry to clarify the predictors of cardiovascular and degenerative bone changes in postmenopausal women. A significant increase in the concentration of HF-CRP, the level of homocysteinine, IL-8, parathyroid hormone, against the background of a significant decrease in the level of estrogen, progesterone, testosterone, with a persistent tendency to increase in total cholesterol, atherogenic lipid fractions, myeloperoxidase, endothelin-1 and decrease was recorded calcitonin, total and ionized calcium, with a significantly minimal value of vitamin D in the 3rd group of patients. The risks of development and progression of bone destructive changes were calculated using the logistic regression method for the group of AH with osteopenia and osteoporosis. Thus, for patients with hypertension and osteopenia, a significantly significant parameter associated with the risk of developing osteoporosis was an indicator of the velocity of the pulse wave, an increase in the level of which exceeds 12.05 m/s is associated with an increased risk of developing osteoporosis by 3.8 times. Increased levels of pro-inflammatory parameters, IL-6 and 8, TNF-α, HB-SRB, parathyroid hormone and reduced levels of*

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

*progesterone and IL10, took the most active part in aggravating the degree of available bone tissue destruction. Timely specialized multidirectional study of biochemical and instrumental parameters (in particular, the study of the speed of the pulse wave and densitometry) can be the basis for the development of personalized prevention and treatment tactics for women in order to prevent socially dangerous cardiovascular and bone complications*

**Key words:** *arterial hypertension; postmenopause; osteoporosis; markers of immune inflammatory response; hormonal and mineral – vitamin status.*

**For citation:** *Petelina T.I., Avdeeva K.S., Bykova S.G., Musikhina N.A., Gapon L.I., Gorbatenko E.A., Zueva E.V., Leonovich S.V., Lystsova N.L. Nonspecific parameters of the immune inflammatory response as a link in the pathogenesis of remodeling of the vascular wall and destruction of bone tissue in women with arterial hypertension in postmenopausal women. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (7): 417-423 (in Russ.)  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-417-423>*

**For correspondence:** *Petelina Tatiana Ivanovna, MD, Leading Researcher of the Department of Arterial Hypertension and Coronary Insufficiency of the Scientific Department of Clinical Cardiology; e-mail: [petelina@infarkta.net](mailto:petelina@infarkta.net)*

**Information about the authors:**

Petelina T.I., [http:// orcid. org/ 0000-0001-6251-4179](http://orcid.org/0000-0001-6251-4179)  
Avdeeva K.S., [http:// orcid. org/ 0000-0002-2134-4107](http://orcid.org/0000-0002-2134-4107)  
Musikhina N.A., [http:// orcid. org/ 0000-0001-9607-7245](http://orcid.org/0000-0001-9607-7245)  
Gapon L.I., [http:// orcid. org/ 0000-0002-3620-0659](http://orcid.org/0000-0002-3620-0659)  
Gorbatenko E.A., [http:// orcid. org/ 0000-0003-0858-2933](http://orcid.org/0000-0003-0858-2933)  
Zueva E.V., [http:// orcid. org/ 0000-0002-8716-7019](http://orcid.org/0000-0002-8716-7019)  
Lystsova N.L., [http:// orcid. org/ 0000-0002-3401-6794](http://orcid.org/0000-0002-3401-6794)

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

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

Received 28.05.2019  
Accepted 04.06.2019

В настоящее время атеросклероз (АС) и остеопороз (ОП) относят к хроническим неинфекционным эпидемиям XXI века. Заболевания носят возраст-зависимый характер, но ассоциативность их обусловлена не только увеличением продолжительности жизни, но и наличием этиопатогенетических связей. Атеросклероз и остеопороз имеют ряд общих черт и, прежде всего, бессимптомное течение в дебюте и высокий риск отсроченных осложнений, для атеросклероза это инфаркт и инсульт, для остеопороза – низкотравматичные переломы, которые составляет 30-40% [1].

С позиции современной медицины представляется крайне важным выявление определенных взаимосвязей и общих патогенетических механизмов между различными заболеваниями с целью выработки комплексного и индивидуального подхода к лечению и профилактике заболеваний. Результаты экспериментальных и клинических исследований, проведенных в последнее десятилетие подтверждают, что у бессимптомно дебутирующих атеросклероза и ОП есть общие звенья патогенеза, приводящие к развитию манифестных осложнений. Была показана связь между развитием атеросклероза и снижением минеральной плотности костной ткани (МПК), независимо от возраста пациентов и повышения риска заболеваемости и смертности от последствий АС у больных с ОП. [2]

Различные факторы, влияющие на костный метаболизм, вовлечены в механизм сосудистых заболеваний. Для того, чтобы оценить взаимосвязь между ОП и ССЗ, обусловленными АС, чаще всего используют суррогатные маркеры этих заболеваний – параметры жесткости сосудистой стенки или сосудистая кальцификация и МПК. Оказалось, что сосудистая и костная ткань имеют ряд общих свойств, а сосудистый кальцификат состоит из тех же элементов, что и костная ткань: соли кальция, коллаген I типа, фосфаты, костный морфогенетический белок и др. Высказывалось мнение, что низкая МПК может непосредственно выступать в роли факторов риска АС коронарных артерий [3].

Наиболее явно связь между АС и ОП прослеживается у женщин в постменопаузе. В условиях дефицита эстрогенов снижается способность эндотелиальных клеток продуцировать оксид азота, поддерживающий эластичность артерий и оказывающий стимулирующее действие на остеобласты, что одновременно приводит к эндотелиальной дисфункции и нарушениям костного метаболизма [2, 3].

Наряду с дефицитом половых стероидов, большое значение придается отрицательному кальциевому балансу, обусловленному дефицитом витамина D и сниженной абсорбции кальция в кишечнике, что в итоге приводит к развитию вторичного гиперпаратиреоза и повышенной резорбции костной ткани [4,5]. Среди нарушений, приводящих как к остеопорозу, так и ССЗ, следует отнести повышение активности симпатической вегетативной нервной системы, что вместе с дисфункцией эндотелия вызывает нарушение в системе микроциркуляции. Важнейшим механизмом снижения МПКТ считается ухудшение перфузии костной ткани, связанное с нарушением в системе микроциркуляции. Состояние микроциркуляции, определяя величину периферического сосудистого сопротивления, за счет синдрома «обкрадывания» в большой степени влияет на состояние перфузии внутренних органов, в том числе костной ткани [6].

Роль ангиотензина II в развитии заболеваний сердечно-сосудистой системы хорошо изучена. Помимо сосудосуживающего эффекта, он обладает существенной провоспалительной активностью в сосудистой стенке (стимулирование продукции реактивных окисленных частиц, воспалительных цитокинов, молекул адгезии) и способствует формированию и прогрессированию атеросклероза. Рецепторы к ангиотензину II выявлены в культуре клеток костной ткани (osteoblasts и osteoclasts). Ангиотензин II способствует выработке RANKL osteoblastами, что приводит к дополнительной активации osteoclastов и усилению резорбции кости, а также ингибированию её минерализацию [7, 8].

Результаты клинических исследований по взаимосвязи между МПКТ и наличием артериальной гипертензии (АГ) и уровнем АД оказались неоднозначными. Некоторые из них выявили отрицательную взаимосвязь между уровнем АД и плотностью кости, другие не выявили взаимосвязи между артериальным давлением и МПКТ [9,10]. Опубликованы также данные, где показано, что жесткость артерий выше у женщин с умеренным сердечно-сосудистым риском и постменопаузальным остеопорозом и тесно взаимосвязана с МПКТ и маркерами костного обмена. Показано, что снижение МПКТ шейки бедра является независимой детерминантой повышения жесткости артерий. Полученные данные позволили предположить, что наличие нарушений минерального обмена костной ткани может быть дополнительным фактором риска поражения сосудистой стенки, который необходимо учитывать при определении общего сердечно-сосудистого риска пациента [11-14].

При устойчивом старении населения в XXI веке данные по ассоциации процессов сердечно-сосудистого ремоделирования и деструкции костной ткани в постменопаузальном периоде сохраняют свой интерес. В последнее время все чаще стали обращать внимание на роль неспецифического иммуно-воспалительной сосудистой ответа как звена общих патогенетических механизмов атеросклеротического поражения сосудистого русла с изменением эластических свойств артерий и явлений дегенеративных костных изменений, что на субклиническом уровне имеет большое значение в проведении комплексных мероприятий по профилактике развития осложнений этих коморбидных состояний в целом.

Цель исследования: изучить роль маркеров неспецифического иммунного воспаления в качестве предикторов сердечно-сосудистых и дегенеративных костных изменений у женщин в постменопаузе с артериальной гипертензией и остеопорозом.

*Материал и методы.* Обследовано 104 пациентки (средний возраст  $57,45 \pm 6,16$  года), которые были разделены на три группы. В 1-ю группу вошли 39 здоровых женщин, во 2-ю группу – 30 пациенток с АГ и остеопенией и в 3 группу – 35 женщин с АГ и остеопорозом.

Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Тюменского кардиологического научного центра, Томского национального исследовательского медицинского центра РАН. Перед включением в исследование у каждого из участников исследования было получено письменное информированное согласие об использовании результатов исследования в научных целях.

Критериями исключения явились: наличие острого нарушения мозгового кровообращения давностью менее 6 месяцев, ишемической болезни сердца, СД 2 типа, хронической сердечной недостаточности (ХСН) функционального класса (ФК) III-IV (по NYHA), онкологических и психических заболеваний.

Диагностика АГ проводилась в соответствии с действующими рекомендациями ЕОГ и РКО. Объем диагностических мероприятий включал: клиническое обследование, лабораторные и инструментальные методы оценки состояния сердечно-сосудистой и костной системы.

Исследование параметров суточного мониторирования артериального давления (СМАД) проводилось всем обследованным по стандартной схеме, с использованием осциллометрического метода, на оборудовании фирмы ВРЛАВ ООО «Петр Телегин» (РФ), с изучением стандартных параметров.

Исследование эластических свойств сосудистой стенки проводили методом сфигмографии на аппарате Vasera VS-1000 Series (Fukuda Denishi, Япония), с оценкой показателей: PWV-R PWV-L – скорость распространения пульсовой волны по артериям эластического типа справа или слева и ABI-R, ABI-L – лодыжечно-плечевой индекс, как показатель периферического сосудистого кровотока и скрининговый параметр наличия атеросклероза сосудов нижних конечностей.

Остеоденситометрия, выполнялась на спиральном компьютерном томографе Siemens Somatom Emotion, исследовались содержание кальция СА-НА и стандартное отклонение пика T-Score (нормативные значения: от 2,0 до -1,0 значения нормы, от -1,0 до -2,5 остеопения, от -2,5 и ниже остеопороз).

Из методов УЗИ проводили ультразвуковое сканирование брахиоцефальных артерий (БЦА), учитывали параметры толщины интима-медиа (КИМ) сонной артерии, состояние сосудистой стенки, наличие атеросклеротических бляшек. Толщина КИМ определялась на расстоянии 2 см от бифуркации общей сонной артерии на задней стенке (норма – менее 0,8 мм, верхняя граница нормы – 0,9 мм, утолщение – более 0,9 мм). За атеросклеротическую бляшку принималось локальное утолщение стенки артерий, превышающее 50% и более толщину прилегающего неизменного КИМ, выступающего в просвет сосуда и отличающегося по своей структуре от неизменной стенки артерий и (или) утолщение КИМ более 1,3 мм [13].

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

На биохимическом автоматическом анализаторе Cobas Integra 400 plus (Швейцария) исследовали параметры липидного обмена. Определение общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови проводили энзиматическим колориметрическим методом; ЛПВП, ЛПНП – прямым энзиматическим колориметрическим методом; методом иммунотурбидиметрии были получены концентрации аполипопротеинов А-I (Апо А-I), аполипопротеинов В (Апо-В), липопротеинов а (Лп (а)) с помощью аналитических наборов и контрольных материалов «Roche Diagnostics GmbH» (Германия).

В качестве биохимических маркеров воспаления определяли: высокочувствительный С-реактивный белок (вч-СРБ) – иммунотурбидиметрическим методом аналитическим набором «С-reactive protein hs» (BioSystem, Испания) на полуавтоматическом анализаторе открытого типа Clima MC-15 (Испания); интерлейкин-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ), интерлейкин-6 (ИЛ-6), интерлейкин-8 (ИЛ-8), фактор некроза опухоли –  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) – «сэндвич» и гомоцистеин (НУС) – конкурентными методами (твердофазного хемилуминисцентного иммуноферментного анализа) аналитическими наборами: ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, TNF- $\alpha$ , homocystein, соответственно. Уровень половых гормонов (эстрадиол, прогестерон, тестостерон), паратиреоидный гормон исследовали конкурентным, твердофазным, хемилуминисцентным ИФА методом, на реактивах фирмы Siemens Diagnostics, миелопероксидазу исследовали методом сэндвич ИФА на реактивах фирмы eBioscience.

Углеводный обмен оценивали по содержанию глюкозы, гликированного гемоглобина (HbA1c). Концентра-

цию глюкозы крови определяли гексокиназным методом на биохимическом анализаторе «Cobas Integra 400 plus». Гликированный гемоглобин определяли хроматографическим методом с помощью анализатора Bio-Rad D10(США).

Расчетным путем был вычислен коэффициент атерогенности (КА) = Апо В/Апо А-I.

Показателей функциональной активности эндотелия в сыворотке крови: уровень нитритов определяли на биохимическом анализаторе Humalyzer 2000 Human (Германия) и эндотелина-1-21 – на иммуноферментном полуавтоматическом анализаторе «Dynatech» (Германия).

**Статистическая обработка данных.** Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica (SPSS Inc, ver 11.5). Тестирование параметров распределения проводилось с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для определения статистической значимости различий непрерывных величин в зависимости от параметров распределения использовались непарный критерий Стьюдента или U-критерий Манна-Уитни, с поправкой Бонферони. Непрерывные переменные, представленные в виде  $M \pm SD$  (среднее  $\pm$  стандартная отклонение) вне зависимости от использованного критерия. Для выявления связи между переменными использовали коэффициент линейной корреляции Спирмена и Пирсона, метод логистической регрессии.

**Результаты и обсуждение.** Характеристика клинико-анамнестических данных обследуемых пациентов представлена в табл. 1.

Из представленных в табл.1 данных видно, что по возрасту пациентки 2-й и 3-й группы достоверно отличались от 1-й группы ( $p < 0,005$ ;  $p < 0,0002$ , соответственно). Достоверной разницы по факту курения и ИМТ во всех группах, стажу гипертонии в группах с АГ не зарегистрировано. Процент наследственности по АГ между группами с наличием АГ не различался, но был существенно ниже в контрольной группе здоровых пациенток. По степени гипертонии зарегистрирован мак-

симальный процент пациенток с 1 степенью АГ во 2-й группе и максимальный процент пациенток с 3 степенью АД в 3-ей группе. Кроме того, пациентки в группе с АГ и остеопорозом имели достоверно более длительный стаж постменопаузы по сравнению со 2-й группой пациенток с АГ ( $p < 0,01$ ).

По данным СМАД достоверная разница параметров была зарегистрирована, только по уровню суточного значения систолического артериального давления (САД 24) и диастолического АД 24 (ДАД 24) между здоровыми в 1-ой группе и пациентками во 2-ой группе, а также по уровню вариабельности САД 24 и ночного ДАД между пациентками во 2-й и 3-й группах ( $p < 0,01$ ). Отсутствие других достоверных изменений в параметрах СМАД можно объяснить достаточной приверженностью пациенток с АГ к проводимой антигипертензивной терапии.

Характеристика структурно-функциональных параметров сосудистой стенки и костной ткани в группах обследуемых пациентов представлена в табл. 2.

По представленным в табл. 2 результатам видно, что скорость пульсовой волны (PWV-R/L) достоверно выше в группах пациенток с АГ по сравнению с контрольной группой пациенток. Максимальный уровень параметра зарегистрирован в 3-й группе, который статистически достоверно превышает показатели во 1-й и 2-й группе пациенток, согласуясь с данными других исследователей, зарегистрировавших повышение жесткости сосудистой стенки у женщин в постменопаузе [2,3].

Показатель КИМ ОСА d/s максимальное значение имеет во 2-й группе пациентов с АГ, достоверно превышая значения в 1-й и 3-й группах. Показатели T-Score и СА критерий закономерно достоверно снижены в 3-й группе пациентов с АГ и остеопорозом по сравнению с 1-й и 2-й группами.

При проведении корреляционного анализа представленных в табл. 2 параметров зарегистрированы взаимосвязи средней силы во 2-й группе – PWV-R с КИМ ОСА d ( $r = 0,415$ ,  $p < 0,06$ ); в 3-й группе СА критерия с PWV-R ( $r = 0,871$ ,  $p < 0,06$ ) и КИМ ОСаd ( $r = -0,673$ ,  $p < 0,002$ ).

Таблица 1

Характеристика клинико-анамнестических данных в группах обследуемых пациентов

Показатели	1 группа Здоровые пациентки (n=39)	P между 1 и 2	2 группа Пациентки с АГ и остеопорозом (n=30)	P между 2 и 3	3 группа Пациентки с АГ и остеопорозом (n=35)	P между 1 и 3
Возраст (лет)	42,92 $\pm$ 13,41	0,005	58,91 $\pm$ 8,28		62,68 $\pm$ 7,16	0,0002
Курят	да – 0%		да – 4,5%		да – 8,8%	
Не курят	нет – 100%		нет – 95,5%		нет – 91,2%	
Стаж АГ (лет)	-		10,33 $\pm$ 8,89		11,87 $\pm$ 9,78	
Степень АГ:						
1	-		37,9 %		14,3%	0,0001
2	-		37,9%		48,6%	
3	-		24,1%		37,1%	
ИМТ (кг/м <sup>2</sup> )	25,08 $\pm$ 3,38		26,14 $\pm$ 2,48		25,48 $\pm$ 2,61	
ОТ (см)	71,01 $\pm$ 6,08	0,016	83,83 $\pm$ 8,31		81,65 $\pm$ 12,38	
ОБ (см)	93,01 $\pm$ 1,41		96,22 $\pm$ 7,28		97,51 $\pm$ 9,93	
Наследственность по АГ	42,9%		68,2%		82,4%	
Отягощена						0,029
Не отягощена	57,1%		31,8%		17,6%	
Стаж постменопаузы (лет)	0,13 $\pm$ 0,40	0,0001	7,27 $\pm$ 5,69	0,013	11,87 $\pm$ 9,78	0,01

Примечание. n- количество пациентов, % - количество пациентов в процентах, p – достоверность различий между группами с поправкой Бонферони ( $p < 0,017$ ).

Таблица 2

**Характеристика структурно-функциональных параметров сосудистой стенки и костной ткани в группах обследуемых пациентов (M±SD)**

Показатели	Здоровые пациентки	<i>P</i>	Пациентки с АГ и остеопенией	<i>P</i>	Пациентки с АГ и остеопорозом	<i>P</i>
	( <i>n</i> =39)	1 и 2		2 и 3		1 и 3
PWV-R, м/с	11,29±0,844	0,0003	12,99±1,52	0,013	14,82±2,81	0,0001
PWV-L, м/с	9,6±0,77	0,006	13,32±1,44	0,043	15,09±2,97	0,005
КИМ ОСА d, мм	0,68±0,14	0,057	1,17±1,78		0,89±0,16	0,012
КИМ ОСА s, мм	0,66±0,11	0,041	1,23±1,79	0,039	0,87±0,15	0,004
T Score	-0,40±0,22		-1,47±0,93	0,001	-3,082±0,64	0,001
СА критерий	-		110,56±16,27	0,001	60,37±26,79	

Примечание. *p* – достоверность различий между группами с поправкой Бонферони (*p*<0,017).

Таблица 3

**Характеристика биохимических показателей в обследуемых группах пациентов (M±SD)**

Показатели	Здоровые пациентки	<i>P</i>	Пациентки с АГ и остеопенией	<i>P</i>	Пациентки с АГ и остеопорозом	<i>P</i>
	( <i>n</i> =39)	1 и 2		2 и 3		1 и 3
<i>Липидный спектр:</i>						
ОХС (ммоль/л)	5,09±1,01		5,54±1,15		5,57±1,18	
ЛПВП (ммоль/л)	1,59±0,39		1,54±0,4		1,73±0,52	
ЛПНП (ммоль/л)	2,83±0,76	0,055	3,32±1,05		3,25±1,17	
ТГ (ммоль/л)	1,21±0,75		1,44±0,85		1,18±0,43	
Апо-А (мг/дл)	187,26±35,7		177,13±27,64		178,7±29,0	
Апо-В(мг/дл)	116,02±139,8		105,75±29,78		105,97±29,42	
Апо-А1/Апо- В (мг/дл)	0,53±0,14		0,6±0,19		0,61±0,16	0,036
Миелопероксидаза (мг/дл)	8,99±9,34	0,054	12,12±9,18		15,02±24,25	0,031
<i>Маркеры воспаления:</i>						
вч-СРБ (мг/л)	2,21±2,8	0,05	2,98±3,0		3,91±2,9	0,001
Фно- α (пг/мл)	4,47±0,06		4,78±1,35		5,04±1,26	
Гомоцистеин (мкмоль/л)	10,88±2,28		12,42±5,47		13,21±5,21	0,068
Ил-1в (пг/мл)	2,49±0,46		2,54±0,53		2,67±1,04	
Ил-6 (пг/мл)	1,65±0,41		2,05±0,80		1,92±0,67	
Ил-8 (пг/мл)	10,40±4,27		10,42±4,64	0,022	12,91±4,75	0,01
Ил-10 (пг/мл)	3,71±0,88		3,33±0,81		3,17±0,76	0,008
<i>Эндотелиальная дисфункция:</i>						
Эндотелин -1(фмоль/л)	1,62±3,97		0,99±2,17		2,1±4,6	
Нитриты (мкмоль/л)	56,21±31,13		68,36±33,63		78,25±40,23	0,016
Нитраты (мкмоль/л)	67,53±38,22		77,61±30,80		90,9±40,33	0,021
Нитриты/нитраты	34,11±30,31		29,12±22,53		31,5±26,49	
<i>Параметры гормонального, кальциевого обмена и витамин Д:</i>						
Эстроген (нмоль/л)	35,54±22,34	0	26,76±9,54		26,7±9,68	
Прогестерон (нмоль/л)	7,97±13,87	0,00012	1,22±1,86		0,88±0,73	0,0001
Тестостерон(нмоль/л)	1,05±0,9		0,87±0,53		0,83±0,52	0,003
Паратгормон (пг/мл)	27,36±16,13		33,75±24,29		40,26±21,44	0,006
Кальцитонин (пг/мл)	1,49±0,37	0,029	1,35±0,28		1,29±15,6	0,031
Витамин Д (нг/мл)	46,24±14,82	0,05	41,51±21,96		39,1±15,14	0,022
Общий кальций (ммоль/л)	2,39±0,11		2,44±0,09	0,011	2,35±0,18	
Кальций ионизированный (ммоль/л)	1,14±0,02		1,17±0,03		1,17±0,43	

Примечание. *n* – количество пациентов, *p* – достоверность различий между группами с поправкой Бонферони (*p*<0,017).

Общность взаимосвязи исследуемых параметров мы решили изучить через определение их взаимосвязи с биохимическими параметрами липидного профиля, воспалительного ответа и эндотелиальной дисфункции сосудистой стенки, показателей гормонального и минерально-витаминного обмена.

Данные лабораторных биохимических показателей в обследуемых группах пациенток представлены в табл. 3.

По данным табл.3 видно, что отмечается стойкая тенденция к повышению уровня ОХС и атерогенных его фракций в группах с наличием АГ по сравнению с 1-й контрольной группой пациентов. Отмечена явная тен-

ИММУНОЛОГИЯ

денция к нарастанию миелопероксидазы, как параметра, отражающего повышенный уровень процесса перекисного окисления в 3-й группе пациенток с АГ и ОП по сравнению с 1-й и 2-й группами.

По результатам маркеров сосудистой воспалительной реакции уровни параметров вч-СРБ, гомоцистемина, ИЛ-8 достоверно выше в 3-й группе пациенток. Тенденция к повышению уровня эндотелина -1 и достоверное превышение в 3-й группе пациенток уровня нитритов, свидетельствует о наличии выраженного процесса эндотелиальной дисфункции у пациенток АГ при наличии остеопороза. Результаты исследования параметров гормонального и минерально-витаминного обмена зарегистрировали в 3-й группе пациентов максимальный уровень паратиреоидного гормона ( $p < 0,006$ ) и сниженный уровень эстрогенов, прогестерона, тестостерона, с тенденцией к снижению кальцитонина, общего и ионизированного кальция, при достоверно минимальном значении витамина D ( $p < 0,01$ ). Полученные нами результаты согласуются с литературными данными и отражают сте-

пень выраженности изменений параметров биохимических маркеров в разных группах пациентов [2, 3].

В работе зарегистрированы множественные разнонаправленные корреляционные взаимосвязи средней силы ( $r > 0,452$   $p < 0,05$ ) представленных структурно-функциональных и биохимических параметров: в 3-й группе были зарегистрированы отрицательные корреляции между пиком Т – Score с возрастом, PWV-L/R, суточным и ночным САД и ДАД, продолжительностью менопаузы, ИЛ6, вч-СРБ, гомоцистеином и между PWV-L с эстрадиолом; положительные корреляции между Т – Score с прогестероном и между PWV/L с ИЛ6, холестерином ХСЛПНП, вч-СРБ, ФНО- $\alpha$  эндотелином-1, средним дневным САД, в дневной вариабельностью САД и ДАД.

Еще в 1935 г. Allen et al. показали, что эстрогены расширяют кровеносные сосуды, улучшают кровообращение, нормализуют функциональное состояние сердца, а в 1957 г. Rorović et al утверждали, что снижение уровня эстрогенов влечет за собой понижение содержания ацетилхолина, что в свою очередь ведет к коронарному и артериальному ишемическому синдрому. Современные данные убедительно доказывают наличие взаимосвязей уровня половых гормонов не только с сердечно-сосудистыми заболеваниями, но и костными деструктивными процессами, а патогенетически ассоциированным звеном этой связи считается пролонгированный сосудистый воспалительный ответ.

Методом логистической регрессии для группы АГ с остеопенией и остеопорозом в постменопаузальном периоде были рассчитаны риски развития и прогрессирования деструктивных изменений. Так, для пациенток с АГ и остеопенией достоверно значимым параметром ассоциированным с риском развития остеопороза явился показатель PWV-R, увеличения которого на 1 ед ассоциируется с повышением риска развития остеопороза в 3,8 раз (ОШ 3,8 95%ДИ 1,81-7,97). Достоверных взаимосвязей биохимических параметров с риском развития остеопороза на данном этапе исследования в этой группе выявлено не было.

В группе АГ с остеопорозом были зарегистрированы риски прогрессирования костного деструктивного процесса при изменении уровня отдельных биохимических маркеров.

Так, риск остеопороза возрастает: при увеличении ИЛ6 на 1 пг/мл в 2,5 раз (ОШ 1,037 ДИ 1,01; 1,065,  $p = 0,048$ ), при увеличении ФНО- $\alpha$  на 1 пг/мл в 2 раза (ОШ 1,99 ДИ 1,107; 0,58,  $p = 0,022$ ), при снижении эстрогена на 1 нмоль/л на 6,5% (ОШ 0,967 ДИ 0,935; 1,00,

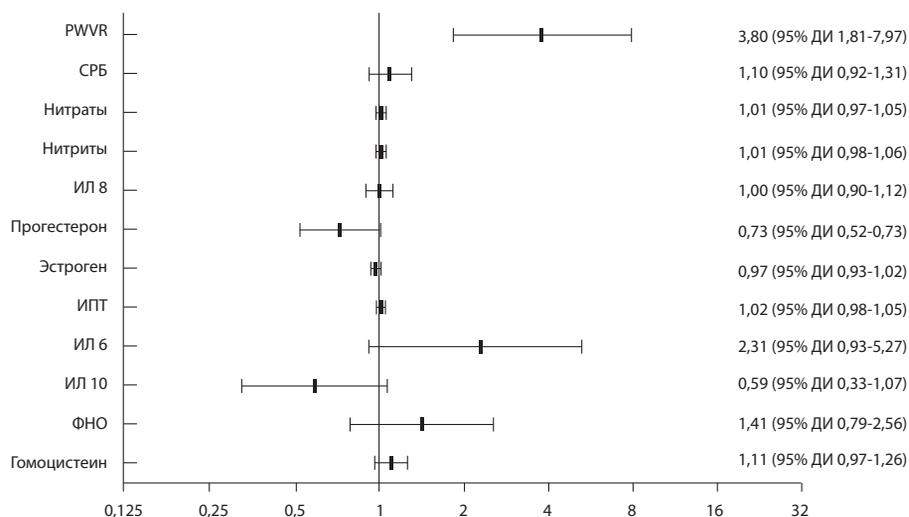


Рис. 1. Отношения шансов, максимально определяющих риск развития остеопороза у пациентов АГ с остеопенией.

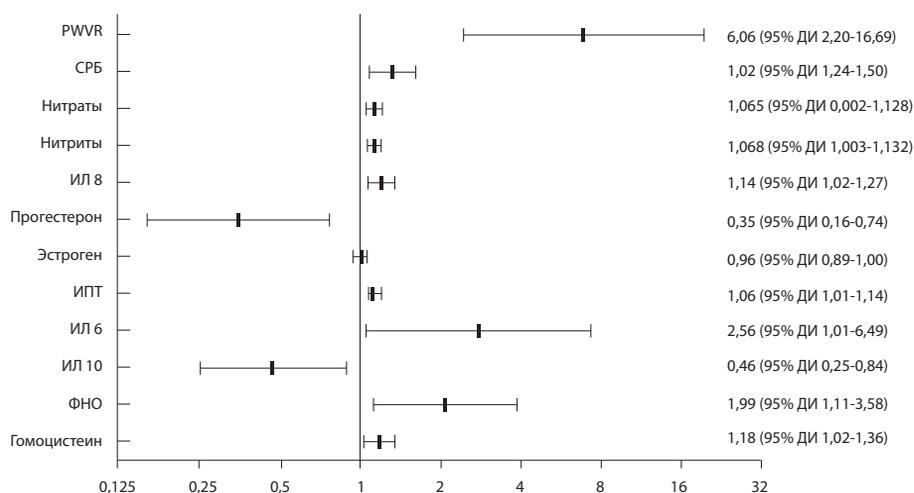


Рис. 2. Отношения шансов, максимально повышающих риск прогрессирования остеопороза у пациентов АГ, уже имеющих остеопороз.

$p=0,052$ ), при увеличении гомоцистеина на 1 мкмоль/л на 18% (ОШ 1,18 ДИ 1,023; 1,361,  $p=0,023$ ), при снижении прогестерона на 1 нмоль/л на 65% (ОШ 0,348 95%ДИ 0,164;0,739,  $p=0,006$ ), при увеличении паратгормона на 1 пг/мл на 3,7% (ОШ 1,037 95% ДИ 1,01; 1,065,  $p=0,009$ ), при увеличении ИЛ 8 на 1 пг/мл на 13,6% (ОШ1,136 95%ДИ 1,016;61,27,  $p=0,025$ , при снижении ИЛ 10 на 1 пг/мл на 54% (ОШ 0,459 95%ДИ 0,252; 0,837,  $p=0,011$ ). Из функциональных показателей – при увеличении PWV на 1 м/с риск остеопороза возрастает в 6 раз (ОШ 6,06 95%ДИ 2,203; 16,69,  $p=0,00048$ ).

Кроме того, в ходе РОК анализа выделены точки отсечения, при достижении которых определяется повышенный риск развития остеопороза: так, при снижении уровня прогестерона менее 0,93 нмоль/л риск остеопороза возрастает в 9 раз (чувствительность 76,9%, специфичность 85,7); при увеличении паратгормона более 28,14 пг/мл риск остеопороза возрастает на 3,7 % (чувствительность 68,6%, специфичность 69, 2%); при увеличении ИЛ 8 более 10,25 пг/мл риск остеопороза возрастает на 13,6% (чувствительность 71,4%, специфичность 64,1); при снижении ИЛ 10 менее 3,465 пг/мл риск остеопороза увеличивается на 54,1% (чувствительность 66,7%, специфичность 62,9%). Из функциональных показателей – при увеличении показателя PWV-R более 12,05 м/с риск остеопороза возрастает в 6 раз (чувствительность 87,1%, специфичность 89,3).

Характеристика отношения шансов, максимально определяющих риск развития остеопороза в группах пациентов АГ с остеопенией и остеопорозом, представлены на рис. 1 и 2.

Согласно данным, представленным на рис. 1, в группе пациентов с остеопенией наиболее достоверным параметром, переделывающим риск развития остеопороза, является величина PWV-R.

Согласно данным, представленным на рис. 2, в усугублении степени имеющейся деструкции костной ткани принимают наиболее активное участие повышенные уровни паратиреоидного гормона, воспалительных маркеров ИЛ-6 и 8, ФНО- $\alpha$ , вч-СРБ и сниженные уровни прогестерона и противовоспалительного ИЛ -10.

**Заключение.** Проведенное исследование позволило уточнить основные маркеры неспецифического иммунного воспалительного ответа и показатели гормонального статуса, которые, определяя степень нарушения эластических свойств сосудистой стенки, риск развития и прогрессирования остеопороза, могут играть роль предикторов сердечно-сосудистых и дегенеративных костных осложнений у женщин с артериальной гипертензией в постменопаузе. Своевременное обследование с использованием биохимических и инструментальных параметров (в частности, исследование скорости пульсовой волны и денситометрии) может стать базой для разработки персонализированной тактики терапии женщин, с целью предотвращения социально опасных сердечно-сосудистых и костных осложнений.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки

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

## ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5–14 с.м. REFERENCES)

1. Скрипникова И. А., Абилова Э. С., Алиханова Н. А., Косматова О. В. Сосудистая жесткость, кальцификация и остеопороз. Общие патогенетические звенья. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2018;17(4): 95–102.
2. Алиханова Н. А., Скрипникова И. А., Ткачева О. Н. и др. Ассоциация параметров сосудистой жесткости и субклинического атеросклероза с костной массой у женщин в постменопаузе. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2016; 2: 51-6.
3. Алиханова Н. А., Скрипникова И. А., Ткачева О. Н. и др. Минеральная плотность кости и состояние сосудистой стенки в зависимости от статуса репликативного клеточного старения у женщин в постменопаузальном периоде. *Остеопороз и остеопатии*. 2015; 3:12-6.
4. Поворознюк В.В., Плудовски П., Балацкая Н.И., Муц В.Я., Климовицкий Ф.В., Резниченко Н.А., Синий О.В., Майлян Э.А., Панькив И.В. Дефицит и недостаточность витамина D: эпидемиология, диагностика, профилактика и лечение. Киев: Научная мысль; 2015.

## REFERENCES

1. Skripnikova I.A., Abirova E.S., Alikhanova N.A., Kosmatova O.V. Vascular rigidity, calcification and osteoporosis. General pathogenetic links. *Kardiovaskularnaya terapiya i profilaktika*. 2018;17(4): 95–102. (in Russian)
2. Alikhanova NA, Skripnikova IA, Tkacheva ON, et al. Association of vascular stiffness parameters and subclinical atherosclerosis with bone mass in postmenopausal women. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2016;2: 51-6. (in Russian)
3. Alikhanova N.A., Skripnikova I.A., Tkacheva O.N. et al. Bone mineral density and vascular wall condition depending on the status of replicable cellular aging in postmenopausal women. *Osteoporos i osteopatii*. 2015; 3: 12-6. (in Russian)
4. Povoroznyuk V.V., Pludovskiy P., Balatskaya N.I., Muts V.Ya., Klimovitskiy F.V., Reznichenko N.A. et al. Vitamin D deficiency and deficiency: epidemiology, diagnosis, prevention and treatment. Kiev: Nauhnay misl'; 2015.
5. Somjen D., Weisman Y., Kohen F. et al. 25-hydroxyvitamin D3 -1 $\alpha$  hydroxylase is expressed in human vascular smooth muscle cells and is upregulated by parathyroid hormone and estrogenic compounds. *Circulation*. 2005;111:1666-71.
6. Wang T.J., Pencina M.J., Booth S.L. et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008;117(4): 503-11.
7. Sagalovsky S. Bone remodeling: cellular-molecular biology and cytokine RANK-RANK-OPG system and growth factors. *Crimea Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2013; 3(1-2): 36-43.
8. Heymann M.F., Herrison F., Dovaine J.M. et al. Role of the RANK-RANK-OPG triad in calcification of the atheromatous plaques: comparison between carotid and femoral beds. *Citokine*. 2012;58(2): 300-6.
9. Datta H.K., Ng W.F., Walker J.A. et al. The cell biology of bone metabolism. *J. Clin. Pathol*. 2008; 61(5): 577-87.
10. Tamaki J., Iki M., Hirano Y. et al. Low bone mass is associated with carotid atherosclerosis in postmenopausal women: the Japanese Population-based osteoporosis (JPOS) Cohort Study. *Osteoporos Int*. 2009; 20: 53-60.
11. Kim L.N., Jang H.M., Kim S.K. et al. Association of Arterial Stiffness and Osteoporosis in Healthy Men Undergoing Screening Medical Examination. *J. Bone Metab*. 2014;21(2): 133-41.
12. Xue-Song Li, Xui He, Yi lin-Shao et al. Bone Mineral Density Is Negatively Associated With Arterial Stiffness in Men With Hypertension. *J. Clin Hypertension*. 2016;11(18):1106-11.
13. Cecelia M., Jiang B., Bevan L. et al. Arterial stiffness relates to arterial calcification but not to noncalcified atheroma in women. *JACC*. 2011;57(13):1480-6.
14. Avramovski P., Avramovska M. Lasaverski M. et al. Femoral neck and spine bone mineral density-surrogate marker of aortic calcification in postmenopausal women. *Anatol. J.Cardiol*. 2016;16(3): 202-9.

Поступила 28.05.19

Принята к печати 04.06.19

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Шутикова А. Л., Леонова Г. Н., Лубова В. А.

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ КАК ОСНОВА СОВРЕМЕННОГО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА КЛЕЩЕВЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова» Министерства образования и науки РФ, 690087, Владивосток, Россия

*Молекулярно-генетический мониторинг природно-очаговых трансмиссивных клещевых инфекций в эпидемической сезон 2018 г. выявил заражённость иксодовых клещей возбудителями вирусного клещевого энцефалита (0,58% случаев), клещевого боррелиоза (31% случаев), моноцитарного эрлихиоза человека (1,6% случаев), гранулоцитарного анаплазмоза человека (3,9% случаев), показал микст-инфицированность клещей данными патогенами (2,9% случаев) в природных и антропоургических очагах (*B. burgdorferi* s.l.+*A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l.+*E. chaffeensis*/*E. muris*, *B. burgdorferi* s.l.+вирус клещевого энцефалита). Основное эпидемиологическое значение имеют клещи *I. persulcatus*, доля которых составила 87,6%. Наибольшее число обращений по поводу укусов клещей поступило с южных и юго-восточных районов Приморья. Выявлена инфицированность клещей боррелиями не только в *I. persulcatus*, но и в клещах родов *Haemaphysalis*, *Dermacentor*. Заражённость клещей *B. burgdorferi* s.l. (42,3%), ВКЭ (7,7%), *A. phagocytophilum* (15,4%) на о. Русский самая высокая.*

**Ключевые слова:** трансмиссивные клещевые инфекции; иксодовые клещи; лабораторная диагностика.

**Для цитирования:** Шутикова А. Л., Леонова Г. Н., Лубова В. А. Молекулярно-генетический мониторинг как основа современного эпидемиологического надзора за клещевыми инфекциями. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (7): 424-429. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-424-429>

*Shutikova A. L., Leonova G. N., Lubova V. A.*

#### MOLECULAR-GENETIC MONITORING AS THE BASIS OF MODERN EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE OF TICK-BORNE INFECTIONS

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia

*Molecular genetic monitoring of natural focal of tick-borne infections in the epidemic season of 2018 revealed infectiousness of ixodid ticks causative agents of tick-borne encephalitis (0.58% of cases), Lyme disease (31% of cases), human monocytic ehrlichiosis (1.6% of cases) and granulocytic anaplasmosis (3.9% of cases) is registered and also co-infections of ticks by these infections (2.9% of cases) is revealed in natural and anthropourgic foci (*B. burgdorferi* s.l.+*A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l.+*E. chaffeensis*/*E. muris* and *B. burgdorferi* s.l.+tick-borne encephalitis virus). The major epidemiological importance of ticks of the species *I. persulcatus* is found, their share being 87,6%. The majority of patients being bitten by a tick were from the southern and southeast areas of Primorye. Contamination of ticks with *Borrelia* was revealed not only in *I. persulcatus*, but also in ticks of the *Haemaphysalis* and *Dermacentor*. The infectiousness of ticks of *B. burgdorferi* s.l. (42,3%), tick-borne encephalitis virus (7,7%) and *A. phagocytophilum* (15,4%) was highest on Russky Island.*

**Key words:** tick-borne infections; ixodid ticks; laboratory diagnostic.

**For citation:** Shutikova A. L., Leonova G. N., Lubova V. A. Molecular-genetic monitoring as the basis of modern epidemiological surveillance of tick-borne infections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64 (7): 424-429 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-424-429>

**For correspondence:** Shutikova A.L., candidate of medical sciences, researcher at the laboratory of natural focal transmissible infections; e-mail: [shutikova79@mail.ru](mailto:shutikova79@mail.ru)

#### Information about authors:

Shutikova A.L., <https://orcid.org/0000-0002-6803-0439>

Leonova G.N., <http://orcid.org/0000-0001-6387-1127>

Lubova V.A., <http://orcid.org/0000-0002-4290-6164>

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

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

Received 25.04.2019  
Accepted 17.06.2019

**Введение.** Природно-очаговые клещевые трансмиссивные инфекции и их сочетанные формы являются актуальной проблемой для здравоохранения на большинстве территорий Российской Федерации (РФ) [1 – 6]. В РФ согласно данным мониторинга 2018 г. в медицинские организации обратилось более 470 тыс. пострадавших от укусов клещей, в том числе более 117 тыс. детей. Зарегистрировано 1525 случаев заболевания клещевым вирусным энцефалитом (КВЭ), 3935 – иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ), 34 – гранулоцитарным анаплазмозом человека (ГАЧ), 11 – моноцитарным эрлихиозом человека (МЭЧ). Количество заболевших КВЭ в России в 2018 г. уменьшилось на 13% по сравнению с аналогичным периодом прошлого года [7].

Распространение клещевых трансмиссивных инфекций характерно для зоны умеренного климата Евразийского континента, в том числе для территорий Сибири и Дальневосточного региона [2, 5, 8]. В природных очагах юга Дальнего Востока (в Приморском крае) циркулируют такие возбудители клещевых инфекций, как вирус клещевого энцефалита (КВЭ), риккетсии, боррелии, эрлихии, анаплазмы [9 – 11].

Переносчиками этих возбудителей являются иксодовые клещи, которые представлены основными родами *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*. Для клещей рода *Ixodes*, обитающих на Восточно-Азиатской хвойно-широколиственной территории, характерен доминирующий вид *Ixodes persulcatus*. Род *Haemaphysalis* представлен видами *Haemaphysalis concinna* и *Haemaphysalis japonica*, предпочитающими кустарниковые заросли и увлажненные склоны по долинам и поймам рек. Род *Dermacentor* представлен видом *Dermacentor silvarum*, обитающим в основном на равнинах и в лесах низгорий западного и южного Сихотэ-Алиня. Для клещей *I. persulcatus*, представляющих высокую значимость в трансмиссивной передаче опасных для человека возбудителей инфекций, как правило, характерна доминирующая численность и повышенная агрессивность по сравнению с другими видами клещей [10 – 12]. Контакт людей с этими членистоногими происходит преимущественно в естественных биотопах обитания иксодовых клещей, в антропоургических очагах, включая городские территории, пригородные зоны, дачные участки, места массового отдыха и сбора дикоросов. Ежегодно в Приморском крае регистрируется около 7 тыс. случаев присасывания клещей, при этом география обращаемости по поводу укусов и выявления патогенов охватывает большинство районов Приморья [13]. По данным Роспотребнадзора эпидемиологическая ситуация по КВЭ в Приморском крае расценивается как относительно благополучная, в то время как заболеваемость ИКБ и клещевыми риккетсиозами (КР) ежегодно превышает

средне-российские показатели [14, 15]. Помимо этого в последние годы показана инфицированность иксодовых клещей новыми для территории Приморского края возбудителями *Ehrlichia chaffeensis*/*Ehrlichia muris*, *Anaplasma phagocytophilum*, вызывающими МЭЧ и ГАЧ [9, 11, 14, 16]. Все это указывает на необходимость наблюдения за эпидемической ситуацией в отношении клещевых инфекций.

Цель работы – провести молекулярно-генетический мониторинг трансмиссивных клещевых инфекций для обоснования современных противоэпидемиологических подходов в сфере надзора за природно-очаговыми инфекциями.

**Материал и методы.** В ходе проведенной работы в эпидемический сезон 2018 г. исследовано 854 экзemplяра (экз.) иксодовых клещей, снятых с людей на 30 административных территориях Приморского края. Исследование выполнено на базе лаборатории природно-очаговых трансмиссивных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова (Владивосток).

Антиген КВЭ в гомогенатах клещей определяли методом ИФА с использованием набора «ВектоКВЭ-антиген» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) по инструкции производителя тест-системы. Методом ИФА исследовано 386 экз. иксодовых клещей. На наличие генетических маркеров КВЭ, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*/*Ehrlichia muris* материал исследовали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием набора «АмплиСенс ТВЕV, *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris-FL*» (ЦНИИ эпидемиологии, Москва) согласно инструкции производителя на амплификаторе с флуоресцентной детекцией «ROTOR-GENE Q» (QIAGEN, Германия). Методом ПЦР-РВ исследовано 503 экз. иксодовых клещей.

**Результаты и обсуждение.** Для инфекций передаваемых иксодовыми клещами характерна выраженная весенне-летняя сезонность. Осень 2018 г. была тёплой и затяжной (положительные температуры регистрировались до начала декабря), плавно переходящей в зиму, что повлияло на удлинение эпидемиологического сезона и привело к появлению молодых особей клещей. Первое обращение в связи с укусом клеща зарегистрировано 30 марта, последнее – 30 октября. Длительность сезона активности клещей, связанная с осенним потеплением составила 215 дней (табл. 1).

**Встречаемость и заражённость иксодовых клещей разных видов.** Основным переносчиком КВЭ в Приморском крае является *I. persulcatus*. В годы повышенной вирусофорности клещей и заболеваемости клещевым энцефалитом, вирус может выделяться и от других до-

Таблица 1

Продолжительность эпидемического сезона клещевых инфекций

Вид клеща	n	Дата обращений		Продолжительность эпидемического сезона (дни/нед.)
		Первый случай	Последний случай	
<i>I. persulcatus</i>	748	3 апреля	8 октября	189/27
<i>Haemaphysalis</i>	70	11 апреля	30 октября	203/29
<i>D. silvarum</i>	36	30 марта	8 октября	193/27,5
Всего	854	30 марта	30 октября	215/30,5

полнительных переносчиков – *H. concinna*, *H. japonica*, *D. silvarum* [10]. По нашим наблюдениям в 2018 г. из общего числа обследованных клещей в ПЦР-РВ и в ИФА ВКЭ обнаружен в 0,58% случаев и только в клещах *I. persulcatus*, что свидетельствует о крайне низкой их вирусофорности (табл. 2).

Зарегистрировано 87,6% случаев укусов людей клещами *I. persulcatus*, случаи присасывания клещей родов *Dermacentor* и *Haemaphysalis* зафиксированы в 4,2% и 8,2%. При исследовании методом ИФА антиген ВКЭ в *I. persulcatus* выявлен в 2 случаях (0,61%), у клещей *Dermacentor* и *Haemaphysalis* антиген ВКЭ не обнаружен. При исследовании методом ПЦР-РВ в клещах *I. persulcatus* выявлены генетические маркеры возбудителей КВЭ в 3 случаях (0,65%), ИКБ – в 152 (33,4%), МЭЧ – в 8 (1,75%), ГАЧ – в 20 (4,4%). В клещах *Haemaphysalis* ДНК *B. burgdorferi s.l.* выявлена в 3 случаях, в клещах *Dermacentor* – в 1 случае (см. табл. 2).

Среди инфицированных клещей в 2,9% случаев диагностированы ассоциации возбудителей клещевых инфекций. Во всех исследованных микст-случаях идентифицированы боррелии группы *B. burgdorferi s.l.*, что обусловлено высокой частотой встречаемости данного возбудителя в популяции иксодовых клещей в Приморском крае. Установлены ассоциации *B. burgdorferi s.l.*+*A. phagocytophilum* (в 1,97%), реже – *B. burgdorferi s.l.*+*E. chaffeensis/E. muris* (в 0,78%), единичный случай *B. burgdorferi s.l.*+ВКЭ (в 0,19%).

**Обращаемость людей различных возрастных групп по поводу присасывания клещей.** Укусам клещей подвергались все возрастные группы населения. Анализ показал, что максимальное количество обращений отмечено среди лиц старше 60 лет 197 случаев (24,1%), минимальное в группе 15-19 лет – 28 случаев (3,4%). Количество обращений в связи с укусом клеща возрастает, начиная с группы 30-39 лет и старше. Такое распределение может быть связано с тем, что лица среднего и пожилого возраста чаще посещают природные очаги в связи с профессиональной трудовой деятельностью, с работой на садово-огородных участках, сбором дикоросов, отдыхом в лесных зонах. Подростки и дети, в силу современного образа жизни, занятые в учебных заведениях и проводящие свой отдых в городской среде, менее подвержены риску встречи с иксодовыми клещами.

Зафиксировано 410 случаев обращения мужчин (54,7%) и 339 женщин (45,3%). При этом среди пострадавших мужчин преобладали представители группы трудоспособного возраста (30-39 лет) – 74 случая (59,2%) и группа старше 60 лет – 75 случаев (45,4%), среди жен-

щин самой многочисленной оказалась группа старше 60 лет – 90 случаев (54,6%).

**Анализ заражённости иксодовых клещей в различных районах Приморского края.** Наибольшее число обращений пострадавшего от укусов клещей населения поступило с южных и юго-восточных районов Приморья (31,4% случаев зафиксировано на территории Владивостокского городского округа (ГО), 28,7% – на территории Надеждинского района). Владивостокский ГО: при исследовании клещей методом ИФА антиген ВКЭ не выявлен, методом ПЦР-РВ из 163 экз. клещей возбудители ИКБ обнаружены в 48 случаях (29,4%), МЭЧ – в 2 (1,2%), ГАЧ – в 9 (5,5%), КВЭ – в 3 (1,8%). Надеждинский район: показатель вирусофорности клещей при исследовании методом ИФА составил 2,2% (2 случая) из 91 проанализированного образца иксодовых клещей. При исследовании 145 экз. клещей методом ПЦР-РВ выявлена их заражённость такими возбудителями клещевых инфекций как *B. burgdorferi s.l.* в 49 случаях (33,7%), *A. phagocytophilum* – в 6 (4,1%), *E. chaffeensis/E. muris* – в 3 (2,06%), ВКЭ не обнаружен.

Артемовский ГО и Шкотовский район: обращаемость населения составила 10,8% случаев. Антиген ВКЭ не обнаружен. При исследовании 38 экз. иксодовых клещей методом ПЦР-РВ зарегистрированы положительные результаты: ДНК боррелий в 16 случаях (32,6%), эрлихий – в 2 (4,1%). ДНК анаплазмы и РНК ВКЭ детектированы не были.

Находкинский ГО и ГО Большой Камень: в этих районах с присасыванием клеща обратилось 77 пострадавших (9,8%). Методом ПЦР-РВ найдены генетические маркеры возбудителей ИКБ в 9 случаях (29,0%), ГАЧ в 1 случае (3,2%). ДНК *E. chaffeensis/E. muris* и РНК ВКЭ не обнаружено. Антиген ВКЭ не выявлен.

Меньшее количество образцов иксодовых клещей исследовано с северных территорий Приморского края (северо-западные, северо-восточные районы Сихотэ-Алиня), районов Приханкайской низменности, Хасанского, Лазовского, Партизанского, Анучинского, Чугуевского районов, с территорий Партизанского и Арсеньевского ГО и пригородных зон ГО ЗАТО Фокино. Обращаемость в лабораторию по поводу присасывания клещей колебалась от 2,15% до 0,63%. Антиген ВКЭ в ИФА и генетический маркер ВКЭ в ПЦР-РВ на территории вышеперечисленных районов не выявлен. Инфицирование клещей возбудителями ИКБ установлено практически на всей территории Приморского края. В клещах Хасанского и Партизанского районов, ГО ЗАТО Фокино и Уссурийского ГО в единичных случаях обнаружена

Таблица 2

Детекция возбудителей трансмиссивных инфекций в иксодовых клещах, присосавшихся к людям

Вид клеща	n	%	ИФА	ПЦР-РВ			
			КВЭ	КЭ	ИКБ	МЭЧ	ГАЧ
Количество исследованных клещей/положительные пробы, %							
<i>I. persulcatus</i>	748	87,6	327/2/0,61 748/5/0,67	455/3/0,65	455/152/33,4	455/8/1,75	455/20/4,4
<i>Haemaphysalis</i>	70	8,2	35/0	36/0	36/3/8,3	36/0	36/0
<i>D. silvarum</i>	36	4,2	24/0	12/0	12/1/8,3	12/0	12/0
Всего	854	100	386/2/0,51 854/5/0,58	503/3/0,59	503/156/31,0	503/8/1,6	503/20/3,9

**Выявление возбудителей клещевых инфекций в иксодовых клещах, снятых с людей на территории Владивостокского городского округа**

Районы	Обращаемость		ИФА	ПЦР			
			КВЭ	КВЭ	ИКБ	МЭЧ	ГАЧ
	n	%	Количество исследованных клещей/положительные пробы, %				
Владивосток (внутригородские территории)	64	25,7	24/0	44/1/2,27	44/11/25	44/0	44/2/4,5
Островные территории <sup>1</sup>	40	16,1	11/0	30/2/6,6	30/13/43,3	30/0	30/4/13,3
Побережье Уссурийского залива <sup>2</sup>	67	27,1	23/0	46/0	46/13/28,3	46/1/2,2	46/1/2,2
Побережье Амурского залива <sup>3</sup>	77	31,1	37/0	44/0	44/11/25,0	44/1/2,3	44/2/4,5
Всего	248	100	95/0	164/3/1,8	164/48/29,3	164/2/1,2	164/9/5,5

Примечание. <sup>1</sup>-Островные территории: о. Русский, о. Попова, о. Рейнеке.

<sup>2</sup>-Побережье Уссурийского залива (территории лесных массивов и прибрежных зон бухт Муравьиная, Стеклянная, Щитовая, Горностаи и микрорайона Емар).

<sup>3</sup>-Побережье Амурского залива (районы: Академическая, Ботанический сад, Весенняя, Океанская, п. Трудовое, мыс Песчаный, Садгород, Сахарный ключ, Спутник, Седанка, 5-й ключ, Лесопитомник, Чайка, 28 км, 14 км, 30 км, 37 км, 32 км).

ДНК *A. phagocytophilum*. В 1 случае идентифицирована ДНК *E. chaffeensis/E. Muris* (Лазовский район).

Анализ заражённости иксодовых клещей на территории Владивостокского ГО. В силу урбанизации и её социально-экономических последствий, таких как увеличение площади городов, присоединение к ним близлежащих населённых пунктов, роста численности населения, городские жители стали чаще подвергаться риску встречи с иксодовыми клещами на территориях синантропных очагов, расположенных непосредственно в границах городов. Владивосток с его обширной пригородной зоной является самым густонаселённым районом Приморского края. При этом на территории Владивостокского ГО расположены многочисленные лесные ландшафты, которые определяют наличие очагов инфекций, передаваемых иксодовыми клещами.

Как следует из табл. 3, наибольшее количество случаев присасывания клещей зарегистрировано на территориях основных мест массового отдыха жителей города и края: острова – 40 случаев (16,1%), побережье Амурского залива – 77 случаев (31,1%), побережье Уссурийского залива – 67 случаев (27,1%). На внутригородских территориях число обращений составило 64 случая (25,7%).

Среди исследуемых образцов иксодовых клещей, проанализированных методом ПЦР-РВ, во всех районах Владивостокского ГО чаще всего выявляли боррелии. Наибольшее количество – 13 случаев (43,3%) зафиксировано на островных территориях. На материковой части в различных микрорайонах г. Владивостока частота выявления ДНК боррелий колебалась от 25% до 28,3%.

Генетические маркёры других бактериальных инфекций (ГАЧ, МЭЧ) идентифицированы в клещах из разных районов Владивостокского ГО: ДНК *A. phagocytophilum* – в 4-х случаях (о. Русский), в 2-х – (Ботанический сад, п. Трудовое), 1 случай (б. Щитовая, микрорайон Снеговая падь, улица Иртышская); ДНК *E. chaffeensis/E. muris* – в 2-х случаях (Сахарный ключ и б. Щитовая). Генетический маркёр ВКЭ детектирован в 2-х образцах (о. Русский) и в 1 клеще – с внутригородских территорий. Антиген ВКЭ в ИФА не выявлен.

Для территории г. Владивостока и его окрестностей выявлена циркуляция ВКЭ, возбудителей ИКБ, новых для Приморского края инфекционных агентов МЭЧ и

ГАЧ. По результатам исследования иксодовых клещей, присосавшихся к людям на территории Владивостокского ГО, показано, что возбудители бактериальных (*B. burgdorferi s.l.*, *A. phagocytophilum*) и вирусных инфекций наиболее часто выявлялись на о. Русском. Заражённость клещей боррелиями там достигала 42,3%, ДНК *A. phagocytophilum* выявлена в 15,4%, РНК ВКЭ детектирована в 2 случаях (7,7%) из 26 обследованных клещей. 19,2% исследуемых клещей на территории о. Русский оказались микст-инфицированными двумя патогенами. Сочетание *B. burgdorferi s.l.*+*A. phagocytophilum* обнаружено в 15,4% случаев, *B. burgdorferi s.l.*+ВКЭ в 3,8% случаев. Полученные результаты позволяют предположить, что на территории о. Русский функционируют активные природные очаги бактериальных и вирусных инфекций, в том числе микст-инфекций, передаваемых иксодовыми клещами. На основании этого, о. Русский может быть отнесён к потенциально опасным районам г. Владивостока в плане заражения возбудителями ВКЭ, ИКБ, ГАЧ, МЭЧ, что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения эпидемической ситуации на данной территории.

Генетические маркёры двух возбудителей – *B. burgdorferi s.l.*+*A. phagocytophilum* выявлены в микрорайоне Снеговая падь и в п. Трудовое. Микрорайон Снеговая падь представляет собой антропогенно-преобразованный ландшафт, который в недавнем прошлом являлся естественным биотопом обитания иксодовых клещей. Об этом свидетельствует, как обращаемость населения по поводу присасывания клеща (2,4%), так и частота обнаружения возбудителей клещевых инфекций (в 2 из 4 проанализированных экз. клещей выявлены возбудители каких-либо инфекций).

Полученные результаты свидетельствуют о наличии природных и антропогенных очагов в различных районах Владивостокского ГО, включая как жилые микрорайоны и внутригородские лесопарковые зоны, так и места массового отдыха горожан на островных и прибрежных территориях.

**Заключение.** По итогам изучения инфицированности присосавшихся к людям клещей, методами ИФА и ПЦР-РВ выявлено наличие следующих инфекционных агентов: вирус клещевого энцефалита, *Borrelia burgdorferi sensu*

*lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis*/*Ehrlichia muris*. Основным переносчиком этих возбудителей на территории Приморского края является *I. persulcatus*. Установлена высокая частота обнаружения ДНК боррелий (31%). ДНК анаплазм и эрлихий выявлена в 3,9% и 1,6% случаев, соответственно. РНК ВКЭ детектирована в 0,59% всех исследованных клещей. Наличие антигена ВКЭ методом ИФА установлено в 2 образцах, что составило 0,51% положительных проб.

Выявлена микст-инфицированность клещей данными патогенами (2,9% случаев) в природных и антропоургических очагах в комбинациях *B. burgdorferi s.l.*+*A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi s.l.*+*E. chaffeensis*/*E. muris.*, *B. burgdorferi s.l.*+ВКЭ.

Анализ эпидемиологической ситуации по ИКБ показал, что инфицированность клещей этими возбудителями на территории Приморского края имеет тенденцию к неуклонному росту и расширению ареала основных переносчиков [9; 11]. Возбудители ИКБ выявлены не только в *I. persulcatus*, но и в клещах родов *Haemaphysalis* и *Dermacentor*, что свидетельствует о сложившейся в Приморском крае неблагоприятной эпидемиологической ситуации в отношении ИКБ. Изучение вирусофорности иксодовых клещей показало тенденцию к снижению инфицированности клещей ВКЭ как в ИФА, так и в ПЦР-РВ в сравнении с прошлым годом [9]. Верифицированы случаи сочетанных инфекций в иксодовых клещах на отдельных территориях, что должно учитываться при проведении профилактики всего комплекса диагностированных инфекций [3, 17 – 19]. Особое внимание следует уделить о. Русский, как потенциальному очагу КВЭ (большинство случаев обнаружения РНК ВКЭ приходилось на данную территорию), ИКБ и ГАЧ (заражённость клещей *B. burgdorferi s.l.* и *A. phagocytophilum* составила 42,3% и 15,4% соответственно, что значительно выше, чем на материковой части Приморского края).

Проблема природно-очаговых трансмиссивных клещевых инфекций требует ежегодного молекулярно-генетического мониторинга для оценки текущей эпидемиологической ситуации. Данные методы исследования позволяют прогнозировать сезонную заболеваемость, выявлять районы наиболее неблагоприятные по риску заражения возбудителями трансмиссивных клещевых инфекций, определять микст-инфицированность переносчиков и заражённость их новыми патогенами.

Результаты мониторинга используются территориальным управлением Роспотребнадзора по Приморскому краю для принятия управленческих решений по оптимизации мер профилактики, в том числе организации противоклещевых обработок.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки. Работа выполнена в рамках научного проекта (0545-2019-0007) Министерства образования и науки.

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Платонов А.Е., Карань Л.С., Гаранина С.Б., Шопенская Т.А., Колясников Н.М., Платонова О.В. и др. Природно-очаговые инфекции в XXI веке в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2009; 2: 30-5.
2. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природно-очаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. Гинцбург А.Л., Злобин В.Н., ред. М.: Наука; 2013.
3. Коренберг Э.И. Изучение и профилактика микст инфекций, передающихся иксодовыми клещами. *Вестник РАМН*. 2001; 11: 41-5.
4. Тихонов С.Н., Полуэктова О.А., Коваленко И.С., Зинич Л.С., Пидченко Н.Н., Раменская О.Ю. Использование метода ПЦР-диагностики при мониторинге гранулацитарного анаплазмоза человека и моноцитарного эрлихиоза в Крыму. В сб.: *Материалы международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018»*. Минск; 2018: 480-1.
5. Леонова Г.Н., Лубова В.А., Бондаренко Е.И. Юг Дальнего востока – эндемичная территория по клещевым инфекциям. В сб.: *Материалы международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018»*. Минск; 2018: 466-7.
6. Алимов А.В., Устюжанин А.В., Санникова Л.Б., Демчук Н.С., Малышкина Г.В., Болгарова Е.В. и др. Частота встречаемости возбудителей инфекций с трансмиссивным механизмом передачи методом ПЦР в клещах, снятых с жителей Свердловской области в 2017 году. В сб.: *Материалы международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018»*. Минск; 2018: 465.
7. О противодействии распространению инфекций, передающихся с укусом клещей 04.09.18г [Электронный ресурс]: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека. URL: [https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news\\_details.php?ELEMENT\\_ID=10594](https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=10594)
8. Ястребов В.К., Рудаков Н.В., Шпынов С.Н. Трансмиссивные клещевые природно-очаговые инфекции в Российской Федерации: тенденции эпидемического процесса, актуальные вопросы профилактики. *Сибирский медицинский журнал*. 2012; 111 (4): 91-3.
9. Берлизова М.В., Лубова В.А., Курловская А.В., Леонова Г.Н. Иксодовые клещи как переносчики возбудителей природно-очаговых заболеваний в эпидемический сезон 2017 года на территории Приморского края. *Здоровье. Медицинская экология*. Наука. 2018; 1(73): 4-12.
10. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае: вирусологические и эколого-эпидемиологические аспекты. Владивосток: Дальнаука; 1997.
11. Лубова В.А., Бондаренко Е.И., Леонова Г.Н. Иксодовые клещи – переносчики возбудителей клещевых инфекций на юге Приморского края (Хасанский район). *Acta biomedica scientifica*. 2018; 3 (4): 21-6.
12. Зверева Т.В., Алленов А.В., Никитин А.Я. Видовые особенности контактов иксодовых клещей с человеком на юге Приморского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4: 14-7.
13. Санитарно-эпидемиологическая обстановка [Электронный ресурс]: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека по Приморскому краю. URL: [http://25.rosпотребнадзор.ru/epidemiologic\\_situation](http://25.rosпотребнадзор.ru/epidemiologic_situation).
14. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Приморском крае в 2017 году». URL: [http://25.rosпотребнадзор.ru/c/document\\_library/get\\_file?uuid=499405fe-0f7d-4955-b259-44e2b377dd4d&groupId=10156](http://25.rosпотребнадзор.ru/c/document_library/get_file?uuid=499405fe-0f7d-4955-b259-44e2b377dd4d&groupId=10156)
15. Носков А.К., Никитин А.Я., Андаев Е.И., Пакскина Н.Д., Яценко Е.В., Веригина Е.В. и др. Клещевой вирусный энцефалит в Российской Федерации: особенности эпидемического процесса в период устойчивого спада заболеваемости, эпидемиологическая ситуация в 2016 г., прогноз на 2017 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 1: 37-43.
16. Бондаренко Е.И., Хворостяно А. А., Курловская А.В. Изучение распространенности на юге Дальнего Востока возбудителей инфекций, передаваемых иксодовыми клещами. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 1 (80): 31-5.
17. Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Трушина Ю.Н., Яковнич Н.В., Андаев Е.И. Выявление и дифференциация возбудителей инфекций, передающихся иксодовыми клещами, из сочетанных природных очагов Прибайкалья. В сб.: *Материалы международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018»*. Минск; 2018: 449-50.
18. Рудаков Н.В., Рудакова С.А. Лабораторная диагностика транс-

миссивных инфекций человека в сочетанных природных очагах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 5: 51-3.

19. Рудакова С.А., Рудаков Н.В., Петрова Ю.А., Березкина Г.В., Околелова Н.А., Коломеец А.Н. Экспресс-выявление молекулярно-биологическими методами патогенов в снятых с пациентов иксодовых клещах как основа превентивной терапии клещевых трансмиссивных инфекций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(10): 615-8.

## REFERENCES

1. Platonov A.E., Karan' L.S., Garanina S.B., Shopenskaya T.A., Kolyasnikova N.M., Platonova O.V. et al. Natural focal infections in the XXI century in Russia. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2009; 2: 30-5. (in Russian)
2. Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. Natural focal infections transmitted by ixodes ticks. [Prirodnoochagovye infektsii, peredayushchiesya iksodovymi kleshchami]. Ginzburg A.L., Zlobin V.N., eds. Moscow: Nauka; 2013. (in Russian)
3. Korenberg E.I. The study and prevention of mixed infections transmitted by ticks. *Vestnik RAMS*. 2001; 11: 41- 5. (in Russian)
4. Tikhonov S.N., Poluektova O.A., Kovalenko I.S., Zinich L.S., Pidchenko N.N., Ramenskaya O. Yu. Use method of PCR diagnostics in the monitoring of human granulocytic anaplasmosis and monocytic ehrlichiosis in the Crimea. Published collections: Materials of the international scientific-practical conference «Molecular diagnostics 2018». [V sb.: Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Molekulyarnaya diagnostika 2018»]. Minsk; 2018: 480-1. (in Russian)
5. Leonova G.N., Lubova V.A., Bondarenko E.I. South Far east – endemic territory for tick infections. Published collections: Materials of the international scientific-practical conference «Molecular diagnostics 2018». [V sb.: Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Molekulyarnaya diagnostika 2018»]. Minsk; 2018: 446-67. (in Russian)
6. Alimov A.V., Ustyuzhanin A.V., Sannikova L.B., Demchuk N.S., Malyshkina G.V., Bolgarova E.V. et al. The frequency of occurrence of pathogens with a transmissible mechanism of transmission by PCR in ticks taken from residents of the Sverdlovsk region in 2017. Published collections: Materials of the international scientific-practical conference «Molecular diagnostics 2018». [V sbornike: Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Molekulyarnaya diagnostika 2018»]. Minsk; 2018: 465. (in Russian)
7. On combating the spread of infections transmitted with tick bite 04.09.18 [Electronic resource]: Federal service for supervision of consumer rights and human welfare. URL: [https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news\\_details.php?ELEMENT\\_ID=10594](https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=10594)
8. Yastrebov V.K., Rudakov N.V., Shpynov S.N. Transmissible tick-borne natural focal infections in the Russian Federation: trends in the epidemic process, topical issues of prevention. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 111 (4): 91-3. (in Russian)
9. Berlizova M.V., Lubova V.A., Kurlovskaya A.V., Leonova G.N. Iksodetic tongs as the carriage of the forgivers of natural-focal diseases to the epidemic season 2017 in the territory of the Primorsky Region. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2018; 1(73): 4–12. (in Russian)
10. Leonova G.N. Tick-borne encephalitis in the Primorsky Territory: virological and ecological and epidemiological aspects. [Kleshchevoy entsefalit v Primorskom krae : virusologicheskie i ekologo-epidemiologicheskie aspekty]. Vladivostok: Dal'nauka; 1997. (in Russian)
11. Lubova V.A., Bondarenko E.I., Leonova G.N. Ixodes ticks as vectors of tick-borne infections in the south of Primorsky Krai (Khasansky district). *Acta biomedica scientifica*. 2018; 3 (4): 21-6. (in Russian)
12. Zvereva T.V., Allenov A.V., Nikitin A.Y. Species determined peculiarities of the tick-man contacts in the south of the Primorsky territory. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2015; 4: 14-7. (in Russian)
13. Sanitary and epidemiological situation [Electronic resource]: Federal service for supervision of consumer rights protection and human welfare in Primorsky Krai. URL: [http://25.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic\\_situation](http://25.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic_situation).
14. State report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in Primorsky Krai in 2017». URL: [http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document\\_library/get\\_file?uuid=499405fe-0-f7d-4955-b259-44e2b377dd4d&groupId=10156](http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document_library/get_file?uuid=499405fe-0-f7d-4955-b259-44e2b377dd4d&groupId=10156)
15. Noskov A.K., Nikitin A.Y., Andaev E.I., Pakskina N.D., Yatsmenko E.V., Verigina E.V. et al. Tick-borne virus encephalitis in the Russian Federation: Features of epidemic process in steady morbidity decrease period. Epidemiological condition in 2016 and the forecast for 2017. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017; 1: 37-43. (in Russian)
16. Leonova G.N., Bondarenko E.I., Khvorostyanko A. A., Kurlovskaya A.V. Study distribute pathogens of tick-borne infections, transmitted of ticks in the south of the Far East. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2015; 1 (80): 31-5.
17. Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Trushina Yu.N., Yakovchits N.V., Andaev E.I. Identification and differentiation of pathogens transmitted by ixodic ticks from the combined natural foci of the Baikal region. Published collections: Materials of the international scientific-practical conference «Molecular diagnostics 2018». [V sb.: Mater. mezhdunar. nauchno-prakticheskoy konferentsii «Molekulyarnaya diagnostika 2018»]. Minsk; 2018: 449-450. (in Russian)
18. Rudakov N.V., Rudakova S.A. Laboratory diagnostics of tick-borne human infections in mixed natural foci. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 5: 51-3. (in Russian)
19. Rudakova S.A., Rudakov N.V., Petrova Yu.A., Berezkina G.V., Okolelova N.A., Kolomeetz A.N. The molecular biological methods of express-detection of pathogens in ticks taken way from patients as a basis of preventive therapy of tick transmissible infections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(10): 615-8. (in Russian)

Поступила 25.04.19

Принята к печати 17.06.19

Харсеева Г. Г.<sup>1</sup>, Мангутов Э. О.<sup>1</sup>, Бут О. М.<sup>2</sup>, Чепусова А. В.<sup>1</sup>, Алутина Э. Л.<sup>1</sup>

## АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ НЕДИФТЕРИЙНЫХ КОРИНЕБАКТЕРИЙ ОТ БОЛЬНЫХ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА

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

<sup>2</sup>МБУЗ «Городская больница № 20 г. Ростова-на-Дону», 344091, Ростов-на-Дону, Россия

Недифтерийные коринебактерии и, в частности, виды *C. pseudodiphtheriticum*, близкородственный ему вид *C. propinquum* и *C. striatum* формируют группу новых респираторных патогенов, приводящих к развитию бронхита, трахеита, обострению хронических обструктивных заболеваний лёгких, нозокомиальной пневмонии и другой патологии. Цель – анализ частоты выделения недифтерийных коринебактерий из верхних дыхательных путей пациентов с различными воспалительными заболеваниями респираторного тракта. Исследованы штаммы недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. accolens* и др.), выделенные от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (60 шт.) и практически здоровых лиц (31 шт.). Идентификацию коринебактерий проводили с помощью метода масс-спектрометрии (MALDI-ToFMS). Недифтерийные коринебактерии в количестве  $10^5$  и выше чаще обнаруживали при развитии хронического тонзиллита (60,0%) и назофарингита (30%). Преимущественно обнаруживали штаммы *C. pseudodiphtheriticum* (40,0±6,4%) и близкородственного ему вида *C. propinquum* (21,7±5,3%); значительно реже – *C. accolens* (8,3±3,6%), *C. afermentans* (6,7±3,3%) и др. В 86,7% случаев недифтерийные коринебактерии изолировали от детей. Чаще при хроническом тонзиллите выделяли *C. pseudodiphtheriticum* близкородственный ему вид *C. propinquum*, при назофарингите и бронхите – *C. pseudodiphtheriticum*. Выделение недифтерийных коринебактерий и, особенно видов *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. accolens* от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта в количестве  $10^5$  и выше при отсутствии в роли микробов-ассоциантов других патогенных микроорганизмов может явиться свидетельством их перехода от комменсализма к патогенности, имеющим клиническое значение.

**Ключевые слова:** недифтерийные коринебактерии, частота выделения; масс-спектрометрический метод; воспалительные заболевания респираторного тракта.

**Для цитирования:** Харсеева Г.Г., Мангутов Э.О., Бут О.М., Чепусова А.В., Алутина Э.Л. Анализ частоты выделения недифтерийных коринебактерий от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (7): 430-434.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-430-434>

Kharseeva G.G.<sup>1</sup>, Mangutov E.O.<sup>1</sup>, But O.M.<sup>2</sup>, Chepusova A.V.<sup>1</sup>, Alutina E.L.<sup>1</sup>

### ANALYSIS OF THE FREQUENCY OF ISOLATION OF *CORYNEBACTERIA NON-DIPHTHERIA* FROM PATIENTS WITH INFLAMMATORY DISEASES OF THE RESPIRATORY TRACT

<sup>1</sup>Federal 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;

<sup>2</sup>Municipal budgetary health care institution, « City hospital No. 20 of Rostov-on-Don », 344091, Rostov on Don, Russia

*Corynebacteria non-diphtheria* and, in particular, *C. pseudodiphtheriticum* species that are closely related to *C. propinquum* and *C. striatum* form a group of new respiratory pathogens leading to the development of bronchitis, tracheitis, exacerbation of chronic obstructive pulmonary diseases, nosocomial pneumonia and other pathology. The goal is to analyze the frequency of the release of *Corynebacteria non-diphtheria* from the upper respiratory tract of patients with various inflammatory diseases of the respiratory tract. Strains of *Corynebacteria non-diphtheria* (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. accolens*, et al.), isolated from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract (60 pcs.) and practically healthy individuals (31 pcs.) were studied. Identification of *Corynebacteria* was performed using the method of mass spectrometry (MALDI-ToFMS). *Corynebacteria non-diphtheria* in the amount of  $10^5$  and higher were more frequently detected with the development of chronic tonsillitis (60.0%) and nasopharyngitis (30%). The strains of *C. pseudodiphtheriticum* (40.0±6.4%) and the closely related species *C. propinquum* (21.7±5.3%) were mainly found; much less often — *C. accolens* (8.3±3.6%), *C. afermentans* (6.7±3.3%), et al. In 86.7% of cases, *Corynebacteria non-diphtheria* were isolated from children. In chronic tonsillitis, *C. pseudodiphtheriticum* and the closely related species of *C. propinquum* were isolated more often; in nasopharyngitis and bronchitis – *C. pseudodiphtheriticum*. Isolation of *Corynebacteria non-diphtheria* and, especially, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. accolens* species from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract in the amount of  $10^5$  and above, if there are no other pathogenic microorganisms in the role of microbial associates, of clinical importance.

**Key words:** *Corynebacteria non-diphtheria*; frequency of excretion; mass spectrometric method; inflammatory diseases of the respiratory tract.

**For citation:** Kharseeva G.G., Mangutov E.O., But O.M., Chepusova A.V., Alutina E.L. Analysis of the frequency of allocation of *Corynebacteria non-diphtheria* from patients with inflammatory diseases of the respiratory tract. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019;64 (7): 430-434 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-430-434>

**For correspondence:** Kharseeva Galina G., Professor, Head of the Department of Microbiology and Virology No. 2; galinagh@bk.ru

**Information about authors:**

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

Mangutov E.O. <https://orcid.org/0000-0001-6959-2540>

Chepusova A.V. <https://orcid.org/0000-0002-4490-7013>

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

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

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

Received 25.06.2019

Accepted 01.07.2019

**Введение.** Недифтерийные коринебактерии входят в состав нормальной микрофлоры респираторного тракта, кожи и слизистых оболочек и их обнаружение в биоматериале от больных не принимают во внимание при интерпретации данных бактериологического исследования [1-3]. В связи с этим вспышки заболеваний, связанных с ними, остаются незамеченными. В последнее время появляется всё больше новых данных, свидетельствующих о роли недифтерийных коринебактерий в развитии нозокомиальных инфекций, особенно у иммунокомпрометированных пациентов [1; 2; 4]. *C. striatum* с множественной лекарственной устойчивостью описан как причина нозокомиальной вспышки и колонизации дыхательных путей у пациентов с хронической обструктивной болезнью лёгких [1]. *C. pseudodiphtheriticum*, близкородственный ему вид *C. propinquum* и *C. striatum* формируют группу новых респираторных патогенов, особенно у пациентов на фоне хронической патологии дыхательных путей [4-6]. Среди коринеформных бактерий *C. pseudodiphtheriticum* и *C. striatum* описаны как патогены дыхательных путей, приводящие к развитию бронхита, трахеита, обострению хронических обструктивных заболеваний лёгких, нозокомиальной пневмонии, формированию абсцессов лёгких [7,8]. *C. pseudodiphtheriticum*, помимо своей роли как этиологического фактора развития воспалительных заболеваний респираторного тракта, может явиться причиной развития и другой патологии (эндокардит, кератит, раневая инфекция, воспалительные заболевания мочевыводящих путей и кожи) [2, 8, 9]. При этом передача *C. pseudodiphtheriticum* от пациента к пациенту не может быть исключена [1]. Недифтерийные коринебактерии чаще выделяют от детей (средний возраст – 4,3 года), чем от взрослых [1].

Бактериологическая диагностика заболеваний, обусловленных недифтерийными коринебактериями, затруднена. Это обусловлено, с одной стороны, их высокой требовательностью к условиям культивирования и присутствием в исследуемом материале других, менее требовательных к условиям культивирования микроорганизмов (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. catarrhalis*), ингибирующих рост недифтерийных коринебактерий [1]. С другой – обычные фенотипические методы исследования не обладают достаточной специфичностью и приводят к двусмысленной или ошибочной идентификации коринеформных микроорганизмов [1]. На сегодняшний день основанием для установления их этиологической роли в развитии патологического процесса является преобладание в материале от больных [10].

Цель исследования – анализ частоты выделения недифтерийных коринебактерий из верхних дыхательных путей пациентов с различными воспалительными заболеваниями респираторного тракта.

**Материал и методы.** Исследованы штаммы недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. accolens*, *C. afermentans*, *C. argentoratense*, *C. aurimucosum*, *C. durum*, *C. falsenii*, *C. freneyi*, *C. tuberculostearicum*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. coyleae*, *C. minutissimum*), выделенные из верхних дыхательных путей (зев, нос) от больных с хроническим тонзиллитом, назофарингитом, бронхитом, пневмонией, ангиной (60 штаммов), 31 штамм от практически здоровых лиц, проходивших профилактическое обследование (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. accolens*, *C. afermentans*, *C. durum*, *C. tuberculostearicum*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. minutissimum*). Все исследованные штаммы недифтерийных коринебактерий получены за период с октября 2018 г. по февраль 2019 г. из бактериологической лаборатории МБУЗ «Городская больница № 20 г. Ростова-на-Дону».

Идентификацию выделенных штаммов недифтерийных коринебактерий проводили с помощью метода масс-спектрометрии (MALDI-ToF-MS) [11]. Для проведения MALDI-ToF-MS из подозрительных на коринебактерии колоний, выращенных на кровяно-теллуритовом и кровяном агаре, получали чистые культуры, которые наносили на мишень масс-спектрометра (MSP-чип). Полученные культуры смешивали в чашке Петри в объёме 2 мкл матрицы, представляющей собой  $\alpha$ -циано-гидроксикоричную кислоту (HGGA, Bruker Daltonics) в 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты. Смесь готовили путём добавления 1 мкл органического растворителя к 10 мг HGGA, затем смешивали на вортексе в течение 30 мин. до полного растворения кристаллов гидроксикоричной кислоты. Далее раствор использовали в качестве матрицы для кристаллизации белков. В качестве стандарта калибровки использовали коммерческий препарат DH5-alpha *E. coli* (Bruker bacteria teststandart). Определяли коэффициент совпадения (Score Value). Результаты идентификации со значением коэффициента Score >2,0 считали достоверными. Учёт результатов проводили с помощью прибора Bruker Daltonics Biotyper (Германия) с использованием программного обеспечения Flex-control для идентификации штаммов рода *Corynebacterium* и сравнением со спектрами из базы данных.

**Результаты.** В исследование взяты штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта в количестве  $10^5$  КОЕ/мл и более и от практически здоровых лиц – в количестве  $10^4$  КОЕ/мл и менее. Отбирали штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные как без микроорганизмов-ассоциантов, так и с микроорганизмами-ассоциантами, являющимися представителями нормальной микрофлоры респираторного тракта.

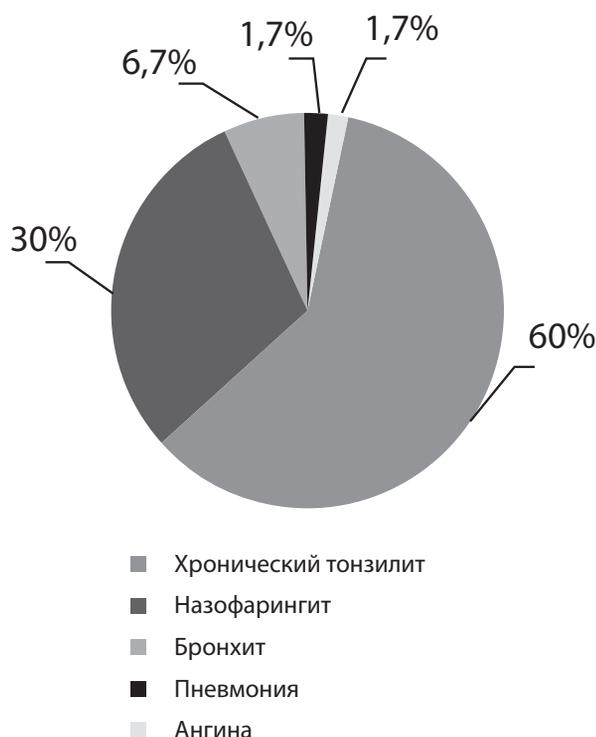
По результатам MALDI-ToF-MS почти у всех исследованных штаммов недифтерийных коринебактерий индекс Score находился в пределах >2,0 что расценивалось как безусловный положительный результат. Исключение составили три штамма (*C. tuberculostearicum*, *C. minutissimum*, *C. accolens*), у которых индекс Score колебался в пределах 1,7-1,8, что свидетельствовало о ненадежной идентификации.

При обследовании больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта недифтерийные коринебактерии наиболее часто обнаруживались при развитии хронического тонзиллита (60% случаев) и назофарингита (30% случаев), тогда как при бронхите, пневмонии и ангине их выделяли значительно реже (6,7%, 1,7% случаев) (см. рисунок).

При рассмотрении частоты выделения различных видов коринебактерий от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта (табл. 1) установлено, что наиболее часто обнаруживались штаммы *C. pseudodiphtheriticum* (40,0±6,4%) и близкородственного ему вида *C. propinquum* (21,7±5,3%); значительно реже – *C. accolens* (8,3±3,6%), *C. afermentans* (6,7±3,3%) и другие виды коринебактерий. В подавляющем большинстве случаев (86,7%) недифтерийные коринебактерии выделяли от детей.

При обследовании практически здоровых лиц (табл. 2) выявлена несколько иная картина. При взятии материала из зева и носа у 41 обследованного недифтерийные коринебактерии выделили только у 31 человека. Наиболее часто от здоровых высевали *C. propinquum* (32,3±8,5%) и *C. accolens* (29,0±8,3%), реже – *C. pseudodiphtheriticum* (19,3±7,2%) и другие виды коринебактерий. При этом частота выделения коринебактерий от детей и взрослых одинакова (51,6 и 48,4% соответственно).

Рассматривая частоту выделения различных видов коринебактерий при воспалительных заболеваниях респираторного тракта (табл. 3) обнаружили, что наиболее часто при хроническом тонзиллите у детей и взрослых выделяли *C. pseudodiphtheriticum* и близкородственный ему вид *C. propinquum*, при назофарингите и бронхите – *C. pseudodiphtheriticum*. Обращает на себя внимание тот факт, что у двух обследованных с назофарингитом *C. pseudodiphtheriticum* обнаружили в



Частота выделения (%) недифтерийных коринебактерий от больных (взрослые и дети) с воспалительными заболеваниями респираторного тракта.

ассоциации с другими видами коринебактерий (*C. afermentans* и *C. simulans*). В то же время у единственного обследованного больного с ангиной выявили сразу три вида недифтерийных коринебактерий (*C. propinquum*, *C. accolens*, *C. aurimucosum*) в количестве 10<sup>6</sup> КОЕ/мл. Из других представителей нормальной микрофлоры в роли микроорганизмов-ассоциантов чаще обнаруживали *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *B. catarrhalis* в количестве 10<sup>4</sup>- 10<sup>5</sup> КОЕ/мл.

**Обсуждение.** Недифтерийные коринебактерии всегда рассматривались как микроорганизмы, не играющие этиологической роли в развитии патологического процесса и, соответственно, не имеющие клинического значения. В последнее время появляется всё больше доказательств их способности вызывать заболевания верхних дыхательных путей, урогенитального тракта, гнойно-септические процессы, нозокоммальные инфекции, особенно, у иммунокомпрометированных лиц [2, 7, 12]. Об этом свидетельствуют и результаты нашего исследования, которые показали, что недифтерийные коринебактерии выделяются в количестве 10<sup>5</sup> и выше от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта, но не от здоровых лиц. При развитии патологического процесса в респираторном тракте коринебактерии значительно чаще (86,7% случаев) выделялись от детей, чем от взрослых, что согласуется с данными других исследователей [1] и, видимо, является закономерным. Наи-

Таблица 1

Частота выделения (абс./%±m) различных видов недифтерийных коринебактерий от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта

Вид	Дети		Взрослые	Всего (дети+взрослые)	
	Абс.	%		Абс.	%
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	24	46,1±6,9	-	24	40,0±6,4
<i>C. propinquum</i>	9	17,3±5,3	4	13	21,7±5,3
<i>C. accolens</i>	2	3,8±2,7	3	5	8,3±3,6
<i>C. afermentans</i>	4	7,7±3,7	-	4	6,7±3,3
<i>C. amycolatum</i>	3	5,8±3,3	-	3	5,0±2,8
<i>C. argentoratense</i>	3	5,8±3,3	-	3	5,0±2,8
<i>C. falsenii</i>	2	3,8±2,7	-	2	3,4±2,4
<i>C. tuberculostearicum</i>	2	3,8±2,7	1	2	3,4±2,4
<i>C. freneyi</i>	1	1,9±1,9	-	1	1,7±1,7
<i>C. coyleae</i>	1	1,9±1,9	-	1	1,7±1,7
<i>C. minutissimum</i>	1	1,9±1,9	-	1	1,7±1,7
Всего	52	100%	8	60	100%

Таблица 2

**Частота выделения (абс./%±m) различных видов недифтерийных коринебактерий от практически здоровых людей**

Вид	Дети		Взрослые		Всего (дети+взрослые)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>C. accolens</i>	4		7		11	35,5±8,7
<i>C. propinquum</i>	6		3		9	29,0±8,3
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	4		1		5	16,1±6,7
<i>C. durum</i>	-		2		2	6,5±4,5
<i>C. afermentans</i>	-		1		1	3,2±3,2
<i>C. xerosis</i>	-		1		1	3,2±3,2
<i>C. amycolatum</i>	1		-		1	3,2±3,2
<i>C. tuberculostearicum</i>	1		-		1	3,2±3,2
Всего	16	51,6%	15	48,4%	31	100%

Таблица 3

**Штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные с микроорганизмами-ассоциантами от больных (детей и взрослых) с воспалительными заболеваниями респираторного тракта**

Диагноз	Вид	Общее количество	Количество с микробами-ассоциантами	Микробы-ассоцианты
Хронический тонзиллит (n=36)	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	12	2	<i>B. catarrhalis</i> 10 <sup>5</sup> , <i>S. epidermidis</i> 10 <sup>4</sup>
	<i>C. propinquum</i>	12	3	<i>C. afermentans</i> 10 <sup>5</sup> / <i>S. epidermidis</i> 10 <sup>4</sup> , <i>S. epidermidis</i> 10 <sup>5</sup> , <i>P. mirabilis</i> 10 <sup>4</sup>
	<i>C. accolens</i>	5	2	<i>E. faecalis</i> 10 <sup>4</sup> , <i>S. epidermidis</i> 10 <sup>6</sup>
	<i>C. falsenii</i>	2	-	-
	<i>C. tuberculostearicum</i>	2	1	<i>E. faecalis</i> 10 <sup>2</sup>
	<i>C. coyleae</i>	1	-	-
	<i>C. afermentans</i>	1	-	-
Назофарингит (n=18)	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	10	4	<i>C. afermentans</i> 10 <sup>6</sup> , <i>C. simulans</i> 10 <sup>6</sup> , <i>B. catarrhalis</i> 10 <sup>5</sup> , <i>E. faecalis</i> 10 <sup>4</sup>
	<i>C. amycolatum</i>	3	1	<i>S. epidermidis</i> 10 <sup>5</sup>
	<i>C. afermentans</i>	2	2	<i>M. haemolytica</i> 10 <sup>5</sup> , <i>S. epidermidis</i> 10 <sup>5</sup>
	<i>C. argentoratense</i>	2	-	-
	<i>C. tuberculostearicum</i>	1	1	<i>M. haemolytica</i> 10 <sup>4</sup>
	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	2	-	-
Бронхит (n=4)	<i>C. afermentans</i>	1	-	-
	<i>C. minutissimum</i>	1	1	<i>R. mucilaginosa</i> 10 <sup>3</sup>
Пневмония (n=1)	<i>C. argentoratense</i>	1	1	<i>Candida spp.</i> 10 <sup>4</sup>
Ангина (n=1)	<i>C. propinquum</i>	1	1	<i>C. aurimucosum</i> 10 <sup>6</sup> / <i>C. accolens</i> 10 <sup>6</sup>
Всего		60 (100%)	19 (31,7%)	

более часто у детей высеивали *C. pseudodiphtheriticum* (46,1±6,9% случаев) и близкородственный ему вид *C. propinquum* (17,3±5,3% случаев), у взрослых – *C. propinquum* и *C. accolens* (4 и 3 из 8 штаммов соответственно). В составе нормальной микрофлоры дыхательных путей у практически здоровых детей и взрослых чаще обнаруживали эти же виды коринебактерий, но в малом количестве (10<sup>4</sup> КОЕ/мл и менее). Этот факт указывает на то, что *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. accolens*, являясь представителями нормальной микрофлоры, мо-

гут при определённых условиях реализовывать свой патогенный потенциал. Это происходит за счёт имеющих у них факторов патогенности (пили, микрокапсула, клеточная стенка, ферменты патогенности), позволяющих последовательно взаимодействовать с эпителием входных ворот организма, размножаться *in vivo*, преодолевать клеточные и гуморальные механизмы иммунной защиты [2, 7, 12-14]. Ранее установлено, что штаммы *C. pseudodiphtheriticum*, выделенные от больных с патологией респираторного тракта (ангина, хронический тон-

зиллит), обладают более высокой способностью к адгезии и инвазии по сравнению с коринебактериями этого же вида, изолированными от практически здоровых лиц [12]. Возможно, высокая адгезивная и инвазивная активность недифтерийных коринебактерий и, особенно, вида *C. pseudodiphtheriticum*, предрасполагает к развитию затяжного хронического процесса в респираторном тракте. Не случайно, по нашим данным, недифтерийные коринебактерии выделяются наиболее часто (в 60% случаев) от больных с хроническим тонзиллитом, причём наиболее восприимчивыми к ним оказались дети.

Интересным наблюдением является выделение от больного с ангиной сразу трёх видов недифтерийных коринебактерий (*C. propinquum*, *C. accolens*, *C. aurimucosum*) в большом количестве ( $10^6$  КОЕ/мл), что указывает на их роль в развитии заболевания. Помимо этого, *C. pseudodiphtheriticum* выделяли в ассоциации с *C. afermentans* и *C. simulans* от больного с хроническим тонзиллитом и двух больных с назофарингитом в больших количествах ( $10^6$  КОЕ/мл).

**Заключение.** Выделение недифтерийных коринебактерий и, особенно видов *C. pseudodiphtheriticum*, *C. propinquum*, *C. accolens* от больных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта в количестве  $10^5$  и выше при отсутствии в роли микроорганизмов-ассоциантов других патогенных микроорганизмов может явиться свидетельством их перехода от комменсализма к паразитизму, имеющему клиническое значение.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-5, 7, 9 см. REFERENCES)

3. 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. Харсеева Г.Г. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты М.: Практическая медицина; 2014.
9. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Гасретова Т.Д., Мамычева Н.И., Голованова Н.А. Персистентные свойства *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2012; 3: 13-7.
11. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Миронов А.Ю., Алутина Э.Л. Сравнительный анализ методов идентификации *Corynebacterium non diphtheria*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 12(60): 43-6.
12. Алиева А.А., Харсеева Г.Г., Мангутов Э.О., Головин С.Н. Факторы патогенности недифтерийных коринебактерий, выделенных от больных с патологией респираторного тракта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 6(63): 375-8.
13. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А. Факторы патогенности *Corynebacterium non diphtheriae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2016; 3: 97-104.
14. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Тюкавкина С.Ю. Влияние *Corynebacterium non diphtheriae* на функциональную активность и апоптоз макрофагов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2014; 6:96-100.

#### REFERENCES

1. Bittar F., Cassagne C., Bosdure E., Stremler N., Dubus J.C., Sarles J., Reynaud-Gaubert M., Raoult D., Rolain J.M. Outbreak of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* Infection in Cystic Fibrosis Patients, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2010; 16(8): 1231-6.
2. Indumathi V.A., Shikha R., Suryaprakash D.R. Diphtheria-like illness in a fully immunised child caused by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. *Indian J. Med. Microbiol.* 2014; 32 (4):443-5.
3. Mironov A.Yu., Savitskaya K.I., Vorobev A.A., Nesterova M.V. Microflora in diseases of ENT organs and CNS diseases in patients living in the Moscow region. *Vestnik otorinolaringologii*. 2001; 4:31-5. (in Russian)
4. Burkovski A. *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*: Putative probiotic, opportunistic infector, emerging pathogen. *Virulence*. 2015; 6(7): 673-4.
5. Diez-Aguilar M., Ruiz-Garbajosa P., Fernández-Olmos A., Guisado P., Del Campo R., Quereda C., Cantón R., Meseguer M.A. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2013; 32(6): 769-72.
6. Neemuchwala A., Soares D., Ravirajan V., Marchand-Austin A., Julianne V. Kus, Samir N. Patel. In Vitro Antibiotic Susceptibility Pattern of *Non-diphtheria Corynebacterium* Isolates in Ontario, Canada, from 2011 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(4): e01776-17.
7. Kharseeva G.G. Diphtheria: microbiological and immunological aspects. Moscow: *Prakticheskaja meditsina*; 2014. (in Russian)
8. Bernard K., Pacheco A.L., Cunningham I., Gill N., Burdz T., Wiebe D. Emendation of the description of the species *Corynebacterium propinquum* to include strains which produce urease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013; 63: 2146-54.
9. Kharseeva G.G., Voronina N.A., Gasretova T.D., Mamycheva N.I., Golovanova N.A. Persistent properties of *Corynebacterium non diphtheriae* circulating in Rostov-on-Don and Rostov Region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012; 3: 13-7. (in Russian)
10. Los-Arcos I., Len O., Martín-Gómez M.T., Baroja A., Berastegui C., Deu M., Sacanell J., Román A., Gavalda J. Clinical Characteristics and Outcome of Lung Transplant Recipients with Respiratory Isolation of *Corynebacterium spp.* *Journal of Clinical Microbiology*. 2018; 56(8): 142-8.
11. Kharseeva G.G., Voronina N.A., Mironov A.Yu., Alutina, E.L. The comparative analysis of techniques of identification of *Corynebacterium non diphtheriae*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; (12): 43-6. (in Russian)
12. Alieva A.A., Kharseeva G.G., Mangutov E.O., Golovin C.N. Factors pathogenicity of *Corynebacterium non-diphtheria*, isolated from patients with the pathology of the respiratory tract. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 6(63): 375-8. (in Russian)
13. Kharseeva G.G., Voronina N.A. Pathogenicity factors of *Corynebacterium non diphtheriae*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2016; 3: 97-104. (in Russian)
14. Kharseeva G.G., Voronina N.A., Tiukavkina S.Iu. Effect of *Corynebacterium non diphtheriae* on functional activity and apoptosis of macrophages. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*. 2014; (6): 96-100. (in Russian)

Поступила 25.06.19

Принята к печати 01.07.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Каргальцева Н.М.<sup>1</sup>, Кочеровец В.И.<sup>2</sup>, Миронов А.Ю.<sup>1</sup>, Борисова О.Ю.<sup>1</sup>, Бурбелло А.Т.<sup>3</sup>

## МАРКЁРЫ ВОСПАЛЕНИЯ И ИНФЕКЦИЯ КРОВотоКА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

<sup>2</sup>ФГАОУВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РФ», 119991, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Минздрава РФ», 191015, Санкт-Петербург, Россия

*В ответ на воспаление появляются «острофазовые реактанты» – неспецифические белки, которые могут оценивать тяжесть и прогноз заболевания. К маркёрам острой фазы воспаления относят: С-реактивный белок (СРБ), прокальцитонин (ПКТ), неоптерин (НП), пресепсин (ПСР), фактор некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), СОЭ, общее количество лейкоцитов, нейтрофилов, белковые фракции ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -глобулины), IgM. Концентрация СРБ повышается при бактериальных инфекциях и значительно выше при положительных гемокультурах по сравнению с контаминированными и отрицательными образцами крови. Уровень ПКТ увеличивается при грамотрицательной бактериемии, нормальные уровни наблюдаются при коагулазоотрицательной стафилококковой бактериемии. Параметры ПКТ более полезны, чем СРБ, для предположения о наличии бактериемии. НП уровни повышаются при бактериемии. При инфекции ПСР активизируется быстрее СРБ и ПКТ, чувствительность при сепсисе в 91,4%. У больных инфекционным эндокардитом отмечено высокое содержание ФНО- $\alpha$  при стафилококковой инфекции в крови и низкое – при выделении гемокультуры энтерококков и коринебактерий. Изменение уровней белков острой фазы при воспалении является маркёром инфекции, включая инфекцию кровотока (ИК), но не специфичны для этиологии бактериемии.*

**Ключевые слова:** белки острой фазы; бактериемия; гемокультура.

**Для цитирования:** Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Миронов А.Ю., Борисова О.Ю., Бурбелло А.Т. Маркёры воспаления и инфекция кровотока (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (7): 435-442.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-435-442>

Kargaltseva N.M.<sup>1</sup>, Kotcherovets V.I.<sup>2</sup>, Mironov A.Yu.<sup>1</sup>, Borisova O.Yu.<sup>1</sup>, Burbello A.T.<sup>3</sup>

## INFLAMMATION MARKERS AND BLOODSTREAM INFECTION (REVIEW OF LITERATURE)

<sup>1</sup>G.N.Gabricheskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>North-Western State Medical University named after I.I.Mechnikov, 191015, Saint-Petersburg, Russia

*In response to inflammation there appear «reactants of acute phase» which are nonspecific but they can show the disease gravity and prognosis. The markers of the acute phase are: C-reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), neopterin (NP), presepsin (PSP), necrosis tumor factor  $\alpha$  (NTF- $\alpha$ ), erythrocyte sedimentation rate (ESR), the total amount of leucocytes, neutrophils, protein fractions ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -globulins), IgM. CRP concentrations rise in the presence of bacterial infections and they are significantly higher in the positive blood cultures than in the contamination or negative ones. PCT levels grow in case of gram-negative bacteremia, but the levels are normal in case of coagulase-negative staphylococci bacteremia. PCT levels are more helpful here than CRP levels with suspected bacteremia. NP levels rise in patients with bacteremia. In the presence of infection, PSP becomes more active than CRP and PCT, and PSP sensitivity is 91,4% in patients with sepsis. Patients with infectious endocarditis have high levels of NTF- $\alpha$  in case of staphylococci infection in blood but the levels of NTF- $\alpha$  are low with enterococci and corynebacterium bloodstream infection. In case of inflammation the acute phase protein level changes are infection markers including bloodstream infection but they are not specific for determining any bacteremia aetiology.*

**Key words:** proteins of acute phase; markers; bacteremia.

**For citation:** Kargaltseva N.M., Kotcherovets V.I., Mironov A.Yu., Borisova O.Yu., Burbello A.T. Inflammation markers and bloodstream infection (review of literature). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (7): 435-442 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-435-442>

**For correspondence:** Kargaltseva N.M.; e-mail: [kargaltseva@mail.ru](mailto:kargaltseva@mail.ru)

### Information about authors:

Kargaltseva N. M., <http://orcid.org/0000-0002-3245-5486>

Borisova O. Yu., <http://orcid.org/0000-0002->

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

Kotcherovets V. I., <http://orcid.org/0000-0002->

Burbello A. T., <http://orcid.org/0000-0003-4097-4267>

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

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

Received 17.04.2019  
Accepted 20.04.2019

Для корреспонденции: Каргальцева Наталья Михайловна; e-mail: [kargaltseva@mail.ru](mailto:kargaltseva@mail.ru)

**Введение.** Воспаление – защитная реакция организма на повреждения, которые могут иметь различную природу: физическую, химическую, биологическую [1]. По высказыванию И. И. Мечникова – воспаление – приспособительная реакция организма с важнейшим проявлением на патогенные агенты для обеспечения выздоровления организма.

Ведущую роль в ответе на воспаление играют определённые структуры в различных системах: протеолитической, гемостаза, комплемента и др. [1]. Острофазовый ответ на воспаление включает в себя последовательные процессы в месте повреждения, которые осуществляют медиаторы. Этот метаболический ответ сопровождается изменением биосинтеза ряда белков, которые получили название «белки острой фазы» или «острофазовые реактанты». Индуцируют появление этих белков цитокины. Острофазовые реактанты, главным образом, глобулины, активно реагируют на воспалительный процесс (системный или очаговый), повреждение тканей, наличие микробов в крови. Реактанты синтезируются в печени под действием противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1, 6, 11,  $\gamma$ -интерферона). При повышении концентрации реактантов воспаления повышается устойчивость организма к свободным радикалам повреждённой ткани, подавляется размножение бактерий в очаге воспаления.

Белки острой фазы воспаления делятся на «позитивные»: С-реактивный белок (СРБ), сывороточный амилоид А, лактоферрин, Т-кининоген, апоферритин, пептидогликаны,  $\alpha$ -1-кислый гликопротеин,  $\alpha$ -1-антитрипсин,  $\alpha$ -1-антихимотрипсин, гаптоглобин (Нр), фибриноген, церулоплазмин,  $C_3$  и  $C_4$  компоненты комплемента,  $\alpha$ -2-антиплазмин и «негативные»: альбумин, трансферрин,  $\alpha$ -липопротеид, преальбумин, тироксинсвязывающий глобулин. При воспалении активность и концентрация «позитивных» белков увеличивается с большой (6-8 ч) или малой (72 ч) скоростью, у «негативных» белков снижаются количественные уровни на 30-60%. Выделяют ещё «нейтральные» белки ( $\alpha$ -2-макроглобулин, гемопексин, иммуноглобулины), концентрация которых при воспалении остается в пределах нормальных значений [2].

Функция реактантов воспаления направлена на различные стороны воспалительного процесса. Они регулируют нарушенный гемостаз и антигемостаз, вызывают бактерицидный эффект, способствуют элиминации патогена, проявляют антиоксидантные свойства, предупреждают развитие аутоиммунных реакций. СРБ – гуморальный фактор врождённого иммунитета. Гаптоглобин, лактоферрин, церулоплазмин повышают антиинфекционную резистентность организма за счёт ограничения поступления железа и цинка в ткани, в результате чего развивается гипоферремия и гипоцинкемия и бактерии лишаются факторов роста [3].

Наиболее частым клиническим симптомом воспаления является повышенная температура тела. На первых этапах диагностики воспаления у клинициста возникает один из главных вопросов – является ли лихорадочное состояние следствием инфекции для назначения антимикробной терапии или имеется иная причина. Индикаторы острой фазы обладают высокой чувствительностью к воспалению, но они неспецифичны по отношению к причине воспаления, поэтому ценность биомаркёров воспаления заключается в оценке тяжести и прогноза заболевания.

К общепринятым диагностическим лабораторным маркёрам исторически относили показатели анализа

крови: общее количество лейкоцитов, нейтрофилов, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), СРБ, фибриноген, альбумины,  $\alpha$ -глобулины,  $\beta$ -глобулины,  $\gamma$ -глобулины. Замечено, что при остром процессе воспаления увеличиваются значения СРБ,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов, при хроническом – повышаются значения  $\gamma$ -глобулинов и снижаются показатели альбуминов.

Известен ряд маркёров острой фазы воспаления, некоторые из них находят практическое применение: СРБ, прокальцитонин (ПКТ), Нр, церулоплазмин, неоптерин (НП), предшественника натрийуретического пептида (NT-pro-BNP).

Патогенез воспаления проходит несколько этапов. Иммунокомпетентные клетки мигрируют в очаг воспаления и медиаторы (ИЛ-1, ИЛ-6, интерферон, ФНО- $\alpha$ ) запускают острый ответ, развивающийся быстро, на 2-3-й день воспаления.

Изначально определяли концентрацию СРБ в плазме крови. Первыми методами являлись иммунохимические полуколичественные (латексная и гем-агглютинация, реакция связывания комплемента и преципитации в геле) и затем количественные (электроиммунодиффузия, флуоресцентно-иммунный анализ, радиоэлектроиммунодиффузия, радиоиммунный анализ) [4]. Одним из современных методов является иммунотурбидиметрический. Концентрации СРБ повышаются при инфекционных заболеваниях (бактериальных, грибковых, паразитарных, вирусных), неинфекционных (ревматоидный артрит, инфаркт миокарда, опухоли различной локализации), соматических заболеваниях с инфекционной этиологией (инфекционный эндокардит, ревматизм).

*Лабораторные маркёры.* С-реактивный белок описан в 1930 г. W. Tillet и T. Frances [5], когда они определили белок в сыворотке больных пневмонией. Концентрации СРБ увеличивались при различных инфекционно-воспалительных заболеваниях. СРБ стали считать чувствительным маркёром острой фазы воспаления, но не обладающим специфичностью. Он остается наиболее актуальным показателем острой фазы воспалительных и некротических процессов [6]. Референсное значение СРБ 0,06-5,0 мг/л рассматривается как маркёр инфекции, менее 1 мг/л – как фактор сердечно-сосудистого риска и 0,59 мг/л – как среднее его значение. Он стимулирует миграцию лейкоцитов, влияет на их функциональную активность, инициирует реакции преципитации, агглютинации, активирует фагоцитоз и систему комплемента. В присутствии кальция СРБ связывает определённые участки полисахаридов микроорганизмов и способствует их элиминации. Повышенный уровень СРБ иногда является единственным показателем острой фазы воспаления при вирусной инфекции (10-40 мг/л), бактериальной инфекции (40-200 мг/л), ожогах, сепсисе (300-700 мг/л). Средние значения СРБ: при остром воспалении – 40-200 мг/л, при невыраженном воспалении – 10-40 мг/л, при хроническом воспалении – <10 мг/л. По его концентрации оценивают средний риск (1,0-3,0 мг/л) и высокий риск (более 3,0 мг/л) тяжести воспалительного процесса. СРБ является неспецифическим маркёром воспаления [7], полезен для оценки тяжести воспалительного процесса без учёта его этиологии.

Прокальцитонин описан в 1984 г. [8]. Это гликопротеин, прогормон, предшественник кальцитонина. ПКТ вошёл в число активно используемых биомаркёров воспаления. При инфекции кровотока (ИК) уровень ПКТ увеличивается в течение 6-12 часов. Нормальные зна-

чения варьируют от 0,05 нг/мл до 0,1 нг/мл. При бактериальной инфекции уровни достигают 0,3-1,5 нг/мл, при инфекционном процессе с системным воспалением (септицемия, сепсис) уровни увеличиваются до 10 нг/мл. Высокие показатели ПКТ при бактериемии указывают на тяжёлое течение и неблагоприятный прогноз заболевания. Показана его более высокая чувствительность и специфичность при бактериальной инфекции по сравнению с СРБ, что связано с его быстрым появлением при воспалении. Стимуляторами синтеза ПКТ считают ФНО. Уровень ПКТ в плазме крови определяют иммунофлюоресцентным методом [7]. Показана корреляция между уровнем ПКТ и клиническим состоянием при сепсисе, отмечено диагностическое и прогностическое преимущество ПКТ над СРБ, СОЭ [4]. Увеличение плазменной концентрации ПКТ наступает в течение 2-4-х часов с начала воспаления и продолжается до момента начала терапии. Период полураспада ПКТ около 24 часов [9]. Уровни ПКТ увеличиваются при бактериальной инфекции быстрее, чем уровни СРБ [10]. Хронические небактериальные инфекции, аутоиммунные, другие системные заболевания, как васкулит, неинфекционные и онкологические заболевания не индуцируют адекватные уровни ПКТ, поэтому его концентрация в плазме не растёт. ПКТ относится к маркёру сепсиса, его уровни повышаются независимо от этиологии сепсиса, он не отражает тяжесть сепсиса, не прогнозирует рецидивы.

*Неоптерин* – маркёр воспаления. Повышение его уровня происходит при вовлечении в процесс заболевания клеточного звена иммунной системы. Его выявляют чаще при вирусной инфекции. Скорость его активации низкая и пиковые концентрации появляются на 9-12-й день от начала воспаления [11]. Уровни показателей НП связаны с тяжестью и прогнозом заболевания, эффективностью проводимого лечения.

Определение предшественника натрийуретического пептида (NT-pro-BNP) в качестве маркёра поражения миокарда при недостаточности кровообращения имеет значение в кардиохирургической практике. Повышенные уровни его при сепсисе указывают на неблагоприятный прогноз. Определение этого маркёра проводят в автоматизированной системе для гетерогенного иммунохимического анализа. Нормальные значения NT-pro-BNP составляют <125 пг/мл [7].

Пресепсин (ПСП) – белок, концентрация которого увеличивается при развитии системных инфекций, сепсиса. ПСП описан в 2005 году группой японских исследователей. ПСП активируется быстрее ПКТ и СРБ, но отражает их позиции: тяжесть, динамику заболевания, прогноз исхода воспаления, эффективность начатого лечения. Нормальные показатели ПСП – 294,2 пг/мл. На макрофагах находится мембранный рецепторный белок –  $mCD_{14}$ , который узнает сигнал о наличии бактерий и запускает врождённый иммунитет.  $mCD_{14}$  связывается с определёнными структурами на бактериях и активирует макрофаги, после чего выходит в свободную циркуляцию и становится растворимым  $sCD_{14}$ . Функции этого белка – индуцировать воспаление в эндотелиальных клетках, не содержащих  $mCD_{14}$ . Циркулирующий  $sCD_{14}$  – маркёр ответа моноцитов на действие липополисахаридов бактерий. Повышенные уровни  $sCD_{14}$  связывают с тяжестью воспаления и тенденцией к сепсису. При активации фагоцитоза лизосомальные протеиназы расщепляют  $sCD_{14}$  с образованием специфического фрагмента –  $sCD_{14}$ -ST, который назван пресепсином. ПСП отража-

ет процесс активации фагоцитоза. Уровни ПСП повышаются при бактериальной и микотической инфекции. ПСП определяют при септическом состоянии, его чувствительность при сепсисе составляет 91,4% [12]. ПСП считается маркёром сепсиса в 100% случаев, подтверждается гемокультурами, способен диагностировать сепсис до клинического проявления. Отражает прогностический исход и динамику заболевания.

Сывороточный амилоид А структурно родственен СРБ. Он ослабляет лихорадку, участвует в метаболизме липидов, нарушает защитное действие липопротеидов при реакции острой фазы. Референтное значение – 7 мг/л. Уровни амилоида А повышаются при воспалении инфекционного характера [13].

D-димер – маркёр, способный оценить тяжесть сепсиса и его прогноз.

Цистатин С – маркёр, отражающий тяжесть сепсиса.

Лактоферрин – ферропротеин, синтезируемый макрофагами, обладает бактериостатическим и бактериоцидным действием, фактор врождённого иммунитета [3]. Наибольшее его количество отмечено в ликворе и моче. В очаге воспаления он удерживает нейтрофилы, инициирует замену нейтрофилов на макрофаги [2].

$\alpha$ -1-кислый гликопротеин (орозомукоид) относится к «прочим» белкам. Он является ингибитором трипсина, плазмина, тромбина, гиалуронидазы, агрегации тромбоцитов, функции лимфоцитов, подавляя иммунный ответ. Референтное значение этого белка – 0,5-1,2 г/л [13]. Его активность стимулируется липополисахаридами, которые освобождаются из макрофагов и подавляют иммунореактивность. Он является сильным опсоином для бактерий и способствует их фагоцитозу, связывает эндотоксин грамотрицательных бактерий, нейтрализует и выводит их. Повышенные концентрации появляются при острой инфекции и воспалении с лихорадкой. Совместно с Нр повышенные уровни указывают на реакцию острой фазы при умеренном гемолизе [14]. Пониженные концентрации имеют место при повреждении печени, тяжёлых гастроэнтеропатиях.

$\alpha$ -2-макроглобулин ингибирует большое число протеаз, способен освобождать кровь от интерлейкинов, ФНО, участвует в защитных механизмах против микробов и паразитов. Повышение концентрации  $\alpha$ -макроглобулина указывает на благоприятный исход заболевания [15].

$\alpha$ -1-антитрипсин (ингибитор протеиназ) – активный показатель острой фазы воспаления при инфекционных заболеваниях, ингибитор тромбинаплазмина, трипсина, тормозит эластазу нейтрофилов. Референтное значение – 0,9-2,0 г/л. Его количество увеличивается при острой инфекции, воспалении, распаде клеток. Снижается его концентрация при тяжёлых заболеваниях и переходе в хроническую форму, например, при обструктивной болезни лёгких. Сниженные концентрации этого маркёра оценивают как фактор эндотоксиновой лихорадки в случае снижения детоксикационной функции печени и нарушения терморегуляции организма на эндотоксин [16].

Компоненты комплемента  $C_1, C_3, C_4, C_9$ .

*Фибриноген* – противовоспалительный показатель с ведущей функцией в свертывании крови, активно препятствует развитию отёка.

Гаптоглобин используют для оценки гемолиза, так как он связывается со свободным гемоглобином при гемолизе эритроцитов. Он участвует в удалении некоторых бактерий [14]. Референтные значения показателя за-

висят от возраста: в возрасте от 16 до 60 лет – 1,5-2,0 г/л, старше 60 лет – 3,5-17,5 г/л. Повышенные уровни наблюдаются при воспалении, коллагенозах, аутоиммунных заболеваниях. Сниженные показатели могут свидетельствовать об усилении метаболизма при внутрисосудистом гемолизе [13].

Церулоплазмин осуществляет транспорт меди к ферментам в крови, являясь окислителем, инактивирует свободные кислородные радикалы при воспалении и некоторые протеазы гранулоцитов, способные повреждать ткани. Референсное значение – 0,2-0,6 г/л [11]. Повышенные уровни расцениваются как реакции острой фазы. Сниженные уровни церулоплазмينا при септическом шоке являются плохим прогнозом для больного.

Церулолексин. Эластаза лейкоцитов способствует выходу белков острой фазы воспаления в кровь и является ранним маркером тяжести воспаления [17].

Фибриноектин – криоглобулин, усиливающий фагоцитоз. Его активность при сепсисе изучается.

Ферритин – основной белок хранения железа для синтеза гемоглобина [3]. Референсное значение: мужчины – 30-300 мкг/л, женщины до 50 лет – 10-160 мкг/л, женщины старше 50 лет – 30-300 мкг/л. Повышение ферритина в сыворотке происходит как реакция острой фазы при воспалении.

Альбумин («негативный белок»), его главная функция – поддержание осмотического давления, транспорт гормонов, жирных кислот, билирубина, желчных кислот, витаминов. При воспалении инфекционной этиологии его концентрация понижается. Его референсное значение в сыворотке – 35-52 мг/л [13].

Трансферрин можно отнести в группу «негативных» белков, так как его пониженные концентрации являются маркером острой фазы воспаления и анемии при хронических инфекциях [3]. Референсные значения – 2,0-3,20 г/л. Основная его функция – связывание и транспорт железа в тканях. Повышенные показатели характерны для состояния дефицита железа [13].

К маркерам острой фазы воспаления относятся клинический симптом в виде повышенной температуры тела и показатели крови: СОЭ, общее количество лейкоцитов, нейтрофилов, белковые фракции ( $\alpha$ -,  $\beta_2$ -,  $\gamma$ -глобулины), IgM.

Общее количество лейкоцитов, нейтрофилов повышается при воспалении и более значительно при выделении гемокультуры.

IgM – маркер воспаления. При остром, подостром, постинфарктном состоянии повышаются уровни IgM, СРБ,  $\gamma$ -глобулина, общего количества белка. На ранней стадии острой ишемии миокарда пациенты имеют повышенную иммунную реакцию. Установлена корреляция между иммуноглобулинами и маркерами воспаления [18].

*Клиническое значение маркеров при заболеваниях.* С-реактивный белок является основным биомаркером воспаления, поскольку при воспалении его концентрация резко повышается. Уровни показателей этого маркера в плазме крови увеличиваются в первые 6-10 ч воспаления более, чем в 100 раз. В норме его концентрация незначительная, при воспалении повышенные показатели сохраняются в течение нескольких дней, помогая диагностике. Отмечены низкие концентрации СРБ при бактериальной инфекции [19]. СРБ проявляет повышенную активность при грамположительной бактериемии, так и при грамотрицательной, но специфичность его низка [20].

Показана связь повышенных уровней СРБ и фибриногена с клиническими симптомами при остром коронарном синдроме, отмечены их диагностические свойства. Уровни СРБ повышаются на ранней стадии острого коронарного синдрома, концентрация фибриногена увеличивается через неделю после СРБ [18]. Выявлены повышенные концентрации СРБ и НП у больных при повреждении миокарда, атеросклерозе, ишемической болезнью сердца [21]. НП и СРБ могут служить маркерами сердечно-сосудистых заболеваний.

Отмечена корреляция повышенных уровней маркеров с длительностью лихорадочного периода у больного. Сывороточные уровни НП отражают прогрессирование тяжести респираторного заболевания и продолжительность лихорадки, а уровни СРБ не зависят от длительности и тяжести лихорадки [22].

Показана диагностическая важность ПКТ при системных микозах [23]. Во многих исследованиях отмечена роль ПКТ как дополнительного критерия тяжести воспалительного процесса.

Некоторые маркеры активны при тяжелой пневмонии и инфекциях мочевыводящих путей у взрослых [24]. Отмечена клиническая значимость ПКТ и НП при тяжелом течении пневмококковой пневмонии с неблагоприятным прогнозом. При туберкулезе легких наблюдался высокий уровень НП и низкий ПКТ. Концентрации этих маркеров значительно выше при бактериемии [25]. Диагностическая роль ПКТ показана при бактериальных инфекциях: сепсисе, инфекции дыхательных путей, менингите, инфекционном эндокардите. Отмечается корреляция между уровнями ПКТ и клиническими состояниями: «сепсис», «начинающийся сепсис», «сепсис исключается», отмечено диагностическое и прогностическое преимущество ПКТ над СРБ, СОЭ, уровнем лейкоцитов крови [4]. Отмечена роль ПКТ при лихорадке неясного генеза и отрицательной гемокультуре [7].

При инфекционном эндокардите кроме показателей инфекции (количество лейкоцитов, тромбоцитопения) анализируют маркеры-индикаторы воспаления, определяющие тяжесть заболевания и прогноз: ФНО- $\alpha$ , СРБ, фибриноген,  $\alpha$ -2-макроглобулин,  $\alpha$ -1-антитрипсин, ПКТ, NT-pro-BNP (показатель недостаточности кровообращения). Отмечена роль ПКТ при подозрении на эндокардит [7].

У пациентов с циррозом печени и наличием инфекционных осложнений определяют маркеры воспаления: эндотоксин, лейкоциты, нейтрофилы, D-димеры, СРБ, протеин С, фибриноген. Все анализируемые маркеры являются вспомогательными при диагностике инфекции у больных с циррозом печени и отражают её функциональное состояние. Присутствие эндотоксина в крови не позволяет отличить наличие бактериальной инфекции от эндотоксемии и идентифицировать вид бактерий [26].

Опубликована экспериментальная работа по оценке динамики белковых фракций плазмы крови, как индикатора реакции организма на остеосинтез, с использованием имплантатов из медицинской стали с покрытием смесью нитридов титана и гафния [27]. Эксперимент проведен на кроликах. После перенесенной травмы и развития воспаления наблюдалась диспротеинемия на фоне неизмененного уровня общего белка. Через 5 дней наблюдалось снижение уровня альбуминов и повышение концентрации  $\alpha$ - и  $\beta_2$ -глобулинов. К 180 суткам повысилась концентрация  $\beta_2$ - и  $\gamma$ -глобулинов. Полученные результаты соответствовали в начале воспаления сдвигам

раннего иммунного ответа, которые включали синтез «положительных» реактантов и снижение образования «отрицательных». Поздний ответ реактантов соответствовал специфическому иммунному ответу. Воспаление, травма, оперативное вмешательство, стресс сопровождаются повышенным уровнем «положительных» белков воспаления (глобулины) и сниженным уровнем «отрицательных» белков острой фазы (альбумины) [28]. Белки острой фазы реагируют на воспаление, вызванное остеосинтезом трансплантата, более поздний ответ расценивается как специфический, поскольку в состав  $\beta_2$ -глобулинов входят IgA, IgM, IgG [29]. Авторы оценили изменения в соотношении белковых фракций крови как неспецифические индикаторы воспаления.

*Дифференциальная диагностика бактериальной и вирусной инфекции.* При лихорадочном состоянии больного клиницист дифференцирует повышенную температуру тела на инфекционную или неинфекционную, так как это связано с назначением антимикробной терапии. Клиницисты широко используют для подтверждения бактериальной инфекции лабораторные маркеры: количество лейкоцитов, «сдвиг лейкоцитарной формулы влево», СОЭ, бактериологическое исследование соответствующего биоматериала (кровь, моча, кал, мокрота и т. п.).

Отмечена различная активность ПКТ при воспалении бактериальной или вирусной этиологии. У детей с тяжёлыми бактериальными инфекциями уровень ПКТ может быть до 53 нг/мл, при вирусной инфекции – 1,5 нг/мл.

Для дифференциальной диагностики воспаления бактериальной или вирусной этиологии оценивают показателя СРБ и НП. При остром респираторном заболевании бактериальной природы уровень СРБ имеет более высокие показатели (12,5 мг/нмоль) по сравнению с вирусной инфекцией (1,2 мг/нмоль) и значительно отличается от уровня НП. [30]. Уровень СРБ при вирусной инфекции выше уровня ПКТ, так как при вирусной инфекции дополнительно растёт уровень СРБ, а ПКТ – не изменяется. Даже в случае вирусных менингитов у взрослых и детей в плазме содержится менее 1 нг/мл ПКТ [31].

Невысокий уровень СРБ при вирусных заболеваниях и высокие значения показателя при воспалении бактериальной этиологии дифференцирует заболевание по данному маркеру. При бактериальной инфекции концентрации СРБ могут достигать 200-300 мг/мл [2] и не более 20 мг/л при вирусной инфекции [19].

*Диагностика инфекционных и неинфекционных заболеваний.* СРБ является маркером воспаления инфекционной этиологии, но и при соматическом заболевании его показатели увеличиваются, например, при аутоиммунных, ревматических заболеваниях, злокачественных опухолях, при отторжении трансплантата, при осложнениях хирургических операций на кишечнике, ожирении, атеросклерозе [32–34].

При бактериальной инфекции синдром системного воспалительного ответа (ССВО) является самым чувствительным индикатором инфекции (84,8%), но имеет ложноположительный результат в 37,9%. У больных с ССВО высокая температура, повышенное количество лейкоцитов, СРБ являются специфическими показателями (89,7; 84,5; 94,8% соответственно), но с низкой чувствительностью (48,1; 43,0; 67,1%, соответственно). Для больных в отделении реанимации и интенсивной тера-

пии (ОРИТ) показатели СРБ являются лучшими индикаторами бактериальной инфекции, чем высокая температура тела и количество лейкоцитов [35].

Маркерам сложно различать воспаление инфекционной или неинфекционной природы в виду схожести клинических симптомов. Необходим комплексный подход, включающий данные по биомаркерам, клинические и лабораторные данные для дифференциальной диагностики.

*Маркеры для диагностики инфекции кровотока.* Для диагностики бактериемии оценивали концентрации ПКТ и СРБ у 286 онкологических больных с фебрильной нейтропенией. Бактериemia диагностирована в 13,3% случаев. В группе больных с бактериемией средняя концентрация ПКТ и СРБ выше (2,8 нг/мл и 15,9 нг/мл, соответственно), чем в группе без бактериемии. ПКТ, как наиболее ранний диагностический маркер для определения бактериемии, оказался более полезным, чем СРБ [36].

СРБ проявляет повышенную активность при грамположительных и грамотрицательных бактериемиях, но специфичность его низка [20].

У больных инфекционным эндокардитом отмечено высокое содержание ФНО- $\alpha$  при стафилококковой инфекции, низкое – при наличии в гемокультуре энтерококков и коринебактерий. Высокое содержание СРБ наблюдается при выделении из крови стафилококков и клебсиел. Высокая активность ПКТ отмечена при наличии в крови стафилококков и коринебактерий, низкая – энтерококков [7].

Получение гемокультур важно для диагностики эндovasкулярных инфекций. При отрицательных посевах крови сывороточный СРБ, как хорошо зарекомендовавший себя маркер воспаления, можно использовать в качестве индикатора инфекции. Замечено отсутствие существенных различий между уровнями СРБ у пациентов с изолированной гемокультурой, содержащей облигатные патогены, и у пациентов с контаминированной пробой крови [37]. При ретроспективном анализе взрослых пациентов с синдромом сепсиса без шока не отмечено различий в уровне СРБ у пациентов с лабораторно подтвержденной бактериемией и у пациентов без бактериемии [38]. У онкологических больных установлено значительное различие показателей СРБ у пациентов с бактериемией и без неё. Непостоянный уровень СРБ в пределах <100 мг/л включён в классификационный алгоритм для определения низкого риска бактериемии [39]. Отсутствуют исследования, которые бы показали уровни СРБ как предвестника бактериемии у госпитальных терапевтических больных [40]. Проанализированы уровни СРБ при грамотрицательной и грамположительной бактериемии. При анализе показателей при грамотрицательной бактериемии получены повышенные уровни СРБ, количества лейкоцитов и неизменённые показатели СРБ и лейкоцитов у больных при грамположительной бактериемии. На основании этих двух маркеров антимикробная терапия не назначалась [41].

Показаны результаты диагностики и возможной корреляционной связи между уровнями СРБ, микроскопией мазков из лейкоцитарного слоя крови, окрашенных по Граму, акридиновым оранжевым и выделением гемокультуры при неонатальной септицемии у новорожденных с малым весом при рождении. Определение сывороточного СРБ и микроскопия мазков лейкоцитарного слоя являются простыми методами диагностики септицемии

у детей, поскольку на основании результатов возможно назначение эмпирической антимикробной терапии в течение одного часа без ожидания семи дней получения гемокультуры. Эти методы просты и воспроизводимы в удалённых детских центрах здоровья [42].

У лихорадящих больных проведено сравнительное исследование. Определены уровни СРБ и ПКТ у пациентов с бактериемией, без бактериемии, при контаминации образца крови с целью дифференциации этих состояний по маркерам. Учитывалось, что индукторами появления ПКТ являются провоспалительные цитокины (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-2), эндо- и экзотоксины бактерий [9]. СРБ рассматривался как специфический маркер воспаления и тяжёлых бактериальных инфекций (сепсис, бактериемия) [43]. Пациенты разделены на группы в соответствии с получением гемокультуры: I группа – бактериемия «+», поскольку выделена гемокультура, II группа – бактериемия «-», поскольку гемокультура не выделена, III группа – контаминированная гемокультура. I группу разделена на три подгруппы в зависимости от выделенных возбудителей: грамположительные бактерии, грамотрицательные бактерии, грибы. Уровни маркеров показали различие между грамотрицательной и грамположительной бактериемией, статистически различия не значимы. Уровни маркеров I группы с бактериемией статистически отличались от II и III групп. Оба маркера могут быть использованы, но ПКТ – является более эффективным, чем СРБ для дифференциации бактериемии от состояния без бактериемии или контаминации образца крови, так как чувствительность и специфичность ПКТ (68,2% и 66,4%, соответственно) и СРБ (93,2% и 95,5, соответственно) находятся на высоком уровне. ПКТ способен дифференцировать бактериемию от состояния, при котором она отсутствует, или от ложноположительной гемокультуры при контаминации крови. На основании этого можно решать вопрос о назначении антимикробной терапии [44].

Имеются разноречивые данные по ПКТ при грамотрицательных и грамположительных бактериемиях. Собщалось о наличии более высоких уровней ПКТ при грамотрицательной бактериемии [45]. Другие исследования показали одинаковые уровни данного маркера при грамотрицательной и грамположительной бактериемии [44; 46]. Для назначения антимикробной терапии определение ПКТ нецелесообразно. ПКТ более информативен, чем СРБ для дифференциации бактериемии от состояния без бактериемии [44]. При коагулазоотрицательной стафилококковой бактериемии уровень ПКТ не увеличивается. Этими же авторами определены высокие уровни ПКТ в группе больных без бактериемии, что свидетельствует о том, что другие факторы активизируют этот маркер. Авторы пришли к заключению, что параметры ПКТ более полезны, чем СРБ для предположения о наличии бактериемии, но для дифференциации бактериемии на грамположительную и грамотрицательную не подходят оба маркера.

Низкие уровни ПКТ отмечены при транзиторной бактериемии. Высокие уровни при подтверждённой бактериемии предсказывают тяжёлое течение болезни и неблагоприятный прогноз.

При септицемии уровень ПКТ выше 2 нг/мл. При лечении антибиотиками и при транзиторной бактериемии уровни его не повышаются. При подтверждённой ИК высокие уровни ПКТ предсказывают утяжеление состояния больного. Концентрация ПКТ в 1,6 нг/мл считается

пороговой для дифференциации бактериальных лихорадок от прочих. Снижение уровня ПКТ во время лечения антимикробными препаратами является благоприятным прогностическим признаком. При очаговом воспалении уровень ПКТ ниже, чем при генерализованном, составляя в среднем 0,5-2 нг/мл [31].

Сравнена активность различных маркеров воспаления при сепсисе у детей по показателям: выделение гемокультуры, количество гемоглобина, число лейкоцитов, нейтрофилов, тромбоцитов, СОЭ, СРБ, фибриноген, IgM. К информативным маркерам воспаления отнесены СОЭ и СРБ, которые имели высокую чувствительность (94% и 84%, соответственно). Уровень фибриногена повышен у больных и в контрольной группе, повышенный уровень IgM определён только в 11% случаев [47].

В педиатрии встречаются ситуации, когда времени на выделение гемокультуры нет, требуется срочно дифференцировать бактериемию от контаминации пробы крови. Сравнены уровни СРБ с общим количеством лейкоцитов, нейтрофилов для дифференциации положительных, отрицательных и контаминированных гемокультур у детей с разной инфекционной патологией (пневмония, гастроэнтерит, инфекция мочевого тракта, острый отит). Уровень СРБ выше в группе положительных гемокультур (101 мг/л) по сравнению с группами контаминированных (30,9 мг/л) и отрицательных гемокультур (34,3 мг/л) [27]. В группе больных с выделенными гемокультурами наибольшие концентрации СРБ наблюдались у больных пневмонией и гастроэнтеритом. СРБ в роли маркера способен отличить истинную гемокультуру от контаминации крови.

*Заключение.* Острофазовые реактанты – комплексная многофункциональная группа, включающая компоненты комплемента, белки коагуляции, ингибиторы протеаз, связывающие белки, СРБ и др., увеличивающих в ответ на повреждение тканей свою концентрацию в сыворотке крови [48]. При инфекционном заболевании в организме повышается активность СРБ и ПКТ и отражаются признаки инфекционного процесса: лихорадка, лейкоцитоз, нейтрофилёз, повышение СОЭ, тромбоцитоз. Острое воспаление характеризуется повышенным уровнем  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулинов, одномоментным увеличением СОЭ с фибриногеном; хроническое – увеличением концентрации  $\gamma$ -глобулинов и снижением альбуминов. На практике часто используемым маркером воспаления является СРБ в силу высокой скорости активации (6-8 ч) и возвращением к нормальным показателям на 4-6 день заболевания. Постоянно повышенные уровни СРБ свидетельствуют о патологическом процессе, но не являются диагностическими для любого патологического состояния, поскольку все заболевания сопровождаются повышением уровня показателей СРБ. Определение СРБ не подходит для дифференциации инфекционного процесса и воспалительного ответа, тест на ПКТ чувствителен и высоко специфичен в диапазоне низких значений (от 1 до 5 нг/мл) при очаговом воспалении без бактериемии [31]. В Европе для оценки тяжести инфекционного процесса чаще применяется исследование ПКТ у взрослых пациентов и реже определение СОЭ. Антимикробная терапия не может назначаться на основании полученных показателей уровней маркеров острой фазы воспаления. Гемокультура подтверждает ИК. СРБ быстро реагирует на воспаление, его концентрация возрастает в считанные часы, но в 8,5-54% случаев его показатели остаются на нормальных значениях при выделении возбудителей

из крови [49, 50]. Определение СРБ могут быть полезны для дифференциации истинной инфекции от контаминации, но не для прогнозирования инфекции в преclinical фазе заболевания [49]. Особенностью белков острой фазы воспаления является неспецифичность, которая ограничивает диагностическую значимость [2]. У большинства белков концентрация в крови высоко коррелирует с активностью заболевания, поэтому их определение важно для мониторинга течения заболевания и контроля эффективности лечения. Изменения уровня концентрации белков острой фазы воспаления в случае бактериальной инфекции не являются специфичными, но показывают активность и прогноз заболевания. Комплексная диагностика воспаления включает анализ показателей маркеров, клинические данные, микробиологическое исследование крови. Определение концентрации маркеров служит дополнительным критерием для оценки степени тяжести заболевания, его прогноза, мониторинга эффективности лечения, но не специфической диагностики этиологии заболевания.

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

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

ЛИТЕРАТУРА (пп.5, 6, 8 – 11,17 – 25, 28 – 30,32, 34–50 см. REFERENCES)

1. Воробьев А. А., Миронов А. Ю., Несвижский Ю. В., Нечаев Д. Н. Учение об инфекции. Москва: ООО «Издательский дом «Русский врач»; 2000.
2. Горин В.С., Кондранина Т.Г., Потехина Н.Г. Прогностическая значимость белков острой фазы воспаления в неопложной гинекологии. *Сибирский медицинский журнал*. 2012; 5: 18-23.
3. Леонов В. В., Миронов А. Ю. Железо и микроорганизмы. Ханты-Мансийск: ООО «Печатный мир г. Ханты-Мансийск»; 2016.
4. Зайцев А.А., Овчинников Ю.В., Кондратьева Т.В. Биологические маркеры воспаления при внебольничной пневмонии. *Consilium Medicum*. 2014; 11: 36-41.
7. Семенов Н. А. Клинико-иммунологические критерии активности воспаления при инфекционном эндокардите. Дисс.... канд. мед. наук. Москва; 2009.
12. Вельков В.В. Комплексная лабораторная диагностика системных инфекций и сепсиса: С-реактивный белок, прокальцитонин, пресеппин. Москва: ЗАО «Диакон»; 2015.
13. Слободчикова С.В. Влияние антител и цитокинов на эффективность фагоцитоза *Staphylococcus aureus*. Дисс.... канд. мед. наук. Москва; 2014.
14. Бейсембаева Р.У. Гаптоглобин и его клиническое значение. *Клиническая медицина*. 1986; 1: 13-5.
15. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М. Универсальный модулятор цитокинов а2-макроглобулин. *Иммунология*. 2004; 25 (5): 302-4.
16. Висмонт Ф.И., Шуст О.Г., Шуст Л.Г. Роль альфа1-антитрипсина крови в регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела при эндотоксиновой лихорадке. *Белорусский медицинский журнал*. 2004; 2: 31-3.
17. Щербакова И.В., Ключник Т.П., Ермакова С.А., Скворцова В.И. Лейкоцитарная эластаза и антитела при ишемическом инсульте. *Российский биомедицинский журнал*. 2001; 2: 223-97.
26. Сторожаков Г.И., Мерзликина Н.Н., Ильченко Л.Ю., Федоров И.Г., Теребилина Н.Н., Панченко Л.Ф. и др. Маркеры воспаления у пациентов, страдающих циррозом печени, с наличием инфекционных осложнений. *Архив внутренней медицины*. 2013, 1 (9): 69-73.
27. Ахтямов И.Ф., Шакирова Ф.В., Зубаирова Л.Д., Гатина Э.Б., Алиев Э.И. Динамика сывороточных реактантов острой фазы воспаления при интрамедуллярном остеосинтезе в эксперименте. *Казанский медицинский журнал*. 2014; 95 (3): 395-8.
31. Доменик Гендрель Д.М., Клаудио Бошон Ф.Д. Прокальцитонин

как маркер бактериальных инфекций. Обзорная статья. *Педиатрический журнал инфекционных болезней*. 2000; 19: 579-88.

33. Королева О.С., Затеишиков Д.А. Биомаркеры в кардиологии: регистрация внутрисосудистого воспаления. *Фарматека*. 2007; 8: 30-6.

REFERENCES

1. Vorob'ev A.A., Mironov A.Yu., Nesvizhskij Yu.V., Nechaev D.N. The doctrine of infection. Vorob'ev A.A., ed. Moscow: Russkiy vrach; 2000. (in Russian)
2. Gorin V.S., Kondranina T.G., Potehina N.G. Prognostic value of inflammation acute phase proteins in urgent gynaecology. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 5: 18-23. (in Russian)
3. Leonov V.V., Mironov A.Yu. Iron and microorganisms. Hanty-Mansiysk: ООО «Pechatnyi mir g. Hanty-Mansiysk»; 2016. (in Russian)
4. Zaytsev A.A., Ovchinnikov Yu.V., Kondrateva T.V. Biological markers of inflammation in case of community-acquired pneumonia. *Consilium Medicum*. 2014; 11: 6-41. (in Russian)
5. Tillet W., Francis T. Serological reaction in pneumonia with a non-protein somatic fraction of *Pneumococcus*. *J.Exp.Med.* 1930; 52: 561-71.
6. Musunuru K., Kral B.G., Blumenthal R.S., Fuster V., Campbell C.Y., Gluckman T.J. et al. The use of high sensitivity C-reactive protein in clinical practice. *Nat.Clin.Pract.Cardiovasc.Med.* 2008; 5 (10): 621-35.
7. Semenenko N.A.. Clinical and immunologic criteria of inflammation activity in case of infective endocarditis. Diss.... Moscow; 2009. (in Russian)
8. Le Moulec J., Jullienne A., Chenais J., Lasmoles F., Guliana J.M., Milhaud G. et al. The complete sequence of human preprocalcitonin. *FEBS*.1984; 167: 93-7.
9. Kristoffersen K.B., Sogaard O.S., Wejse C., Black F.T., Greve T., Tarp B. et al. Antibiotic treatment interruption of suspected lower respiratory tract infections based on a single procalcitonin measurement at hospital admission – a randomized trial. *Clin. Microbiol.Infect.* 2009; 15: 481-7.
10. van Rossum A.M.C., Wulkan P.W., Murphy A.M.O. Procalcitonin as an early marker of infection in neonates and children. *Lancet Inf.Dis.* 2004; 4: 620-30.
11. Ruokonen E., Ikka L., Niskanen M., Takala J. Procalcitonin and neoptenin as indicators of infection in critically ill patients. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 2002; 46 (4): 398-404.
12. Velkov V.V. Complex laboratory diagnostics of systemic infections and sepsis: C-reactive protein, procalcitonin, presepsin. Scientific survey. Moscow: ЗАО «Диакон»; 2015. (in Russian)
13. Slobodchikova S.V. The effect of antibodies and cytokines on the effectiveness of phagocytosis *Staphylococcus aureus*. Diss.... Moscow; 2014. (in Russian)
15. Zorin N.A., Zorina V.N., Zorina R.M. Universal modulator of cytokines A2-macroglobulin. *Immunologiya*. 2004; 25 (5): 302-4. (in Russian)
16. Vismont F.I., Shust O.G., Shust L.G. The role of blood alpha1-antitrypsin in the regulation of liver detoxification function and body temperature in endotoxin fever. *Belorusskiy meditsinskiy zhurnal*. 2004; 2: 31-3.
17. Shherbakova I.V., Klushkin T.P., Ermakova S.A., Skvorцова V.I. Leukocyte elastase and antibodies in ischemic stroke. *Rossiyskiy biomeditsinskiy zhurnal*. 2001; 2: 223-97.
18. Koltowski L., Filipiak K., Rdzanek A., Stepien V., Tarchalska-Krynska B., Opolski G. IgG, IgM and inflammatory markers serum concentration in patients with acute coronary syndrome: a pilot study. *Kardiol.Pol.* 2012; 70 (10): 1023-8.
19. Korppi M., Kroger L. C-reactive protein in viral and bacterial respiratory infection. *Scand.J.Infect.Dis.* 1993; 25 (2): 207-13.
20. Prat C., Sancho J.M., Dominguez J., Xicoy B., Gimenez M., Ferra Ch. et al. Evaluation of procalcitonin, neoptenin, C-reactive protein, IL-6 and IL-8 as a diagnostic marker of infection in patients with febrile neutropenia. *Leuk.Lymphoma*. 2008; 49 (9): 1752-61.
21. Fuchs D., Avanzas P., Arroyo-Espliguero R., Jenny M., Consuegra-Sanchez L., Kaski J. The role of neoptenin in atherogenesis and cardiovascular risk assessment. *Curr.Med.Chem.* 2009; 16 (35): 4644-53.

22. Zheng B., Cao K.Y., Chan C.P., Choi J.W.Y., Leung W., Leung M. et al. Serum neopterin for early assessment of severity of severe acute respiratory syndrome. *Clin.Immunol.* 2005; 116 (1): 18-26.
23. Christofilopoulou S., Charvalos E., Petrikkos G. Could procalcitonin be a predictive biological marker in systemic fungal infections? Study of 14 cases. *Eur.J.Intern.Med.* 2002; 13 (8): 493-5.
24. Van Nieuwkoop C., Bonten T.N., Van-t Wout J.W., Kuijper I., Groeneveld G.H., Becker M.J. et al. Procalcitonin reflects bacteremia and bacterial load in urosepsis syndrome: a prospective observation study. *Crit.Care.* 2010; 14 (6): R206.
25. Prat C., Domingues J., Andreo F., Blanco S., Pallares A., Cuchillo F. et al. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J.Infect.* 2006; 52 (3) 169-77.
26. Storozhakov G.I., Merzlikina N.N., Ilchenko L.Yu., Fedorov I.G., Terebilina N.N., Panchenko L.F. et al. Markers of inflammation in patients with liver cirrhosis with infectious complications. *Arhiv vnutrennej mediciny.* 2013; 1 (9): 69-73. (in Russian)
27. Ahtyamov I.F., Shakirova F.V., Zubairova L.D., Gatina Je.B., Aliev Je.I. Dynamics of serum reactants of acute phase of inflammation in intramedullary osteosynthesis in the experiment. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal.* 2014; 95(3): 395-98. (in Russian)
28. Gabay C., Kushner I. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *NEJM.* 1999; (340): 448-54.
29. O'Connell T.X., Horita T.J., Kastravi B. Understanding and interpreting serum electrophoresis. *Am.Fam.Physician.* 2005; 71 (1): 105-12.
30. Rainer T.H., Leung M.F., Leung W., Ip M., Lee N., Graham C.A. Diagnostic utility of CRP to neopterin ratio in patients with acute respiratory tract infections. *J.Infect.* 2009; 58 (2):123-30.
31. Domenik Gendrel D.M., Klaudio Boshon F.D. Procalcitonin as a marker of bacterial infections. Review article. *Pediatricskiy zhurnal infektsionnykh bolezney.* 2000; 19: 579-88.
32. Mesquida M., Molins B., Liorenc V.I., De La Maza M.S., Hernandez M.V., Espinosa G. et al. Proinflammatory cytokines and C-reactive protein in uveitis associated with Bence-Jones disease. *Mediators inflamm.* 2014, doi:10.1155/2014/396204. *Epub.* 2014; jun.8.
33. Koroleva O.S., Zatejshnikov D.A. Biomarkers in cardiology: registration of intravascular inflammation. *Farmateka.* 2007; 8: 30-6. (in Russian)
34. Carpenter L.L., Gawug C.E., Tyrka A.R., Price L.H. C-reactive protein, early life stress and wellbeing in healthy adults. *Act. Psychiatr.Scand.* 2012; 126 (6): 402-10.
35. Yi-Ling Chan, Hao-Chin Liao, Pei-Kuei Tsay, Chang S.S., Chen J.C., Liaw S.J. C-reactive protein as an indicator of bacterial infection of adult patients in the emergency department. *Chang Gung Med.J.* 2002; 25: 437-45.
36. Kim D.Y., Lee Y.S., Ahn S., Lim K.S. The usefulness of procalcitonin and C-reactive protein as early diagnostic markers of bacteremia in cancer patients with febrile neutropenia. *Cancer Res.Treat.* 2011; 43(3): 176-80.
37. McCabe R.E., Remington J.S. C-reactive protein in patients with bacteremia. *J.Clin.Microbiol.* 1984; 20: 317-9.
38. Byl B., Deviere J., Saint-Hubert F., Zech F., Gulbis B., Thys J.P. Evaluation of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6 and C-reactive protein plasma levels as predictors of bacteremia in patients presenting signs of sepsis without shock. *Clin.Microbiol.Infect.* 1997; 3: 306-16.
39. Tokuda Y., Miyasato H., Stein G.H. A simple prediction algorithm for bacteremia in patients acute febrile illness. *QJM.* 2005; 98: 813-20.
40. Ehrenstein B.P., Ehrenstein V., Henke Ch., Linde H.J., Salzberger B., Scholmerich J. et al. Risk factors for negative blood cultures in adult medical inpatients – a retrospective analysis. *DMC Infect.Dis.* 2008; 8: 148-54.
41. Vandijck D.M., Hoste E.A., Blot S.I., Depuydt P.O., Peleman R.A., Decruyenaere J.M. Dynamics of C-reactive protein and white blood cell count in critically ill patients with nosocomial Gram positive vs. Gram negative bacteremia: a historical cohort study. *BMC Infect. Dis.* 2007; 7: 106-13.
42. Dhanalakshmi V., Suguna Sivakumar E. Comparative study in early neonates with septicemia by blood culture, staining techniques and C-reactive protein (CRP). *J.Clin.Diagn.Res.* 2015; 9(3): DC12-DC15.
43. Sakr Y., Sponholz C., Tuche F., Tuch F., Brunkhorst F., Reinhart K. The role of procalcitonin in febrile neutropenic patients: Review of the literature. *Infection.* 2008; 36: 396-406.
44. Oksuz L., Somer A., Salman N., Erk O., Gurler N. Procalcitonin and C-reactive protein in differentiating to contamination from bacteremia. *Braz.J.Microbiol.* 2014; 45: 4.
45. Jeong S., Park Y., Cho Y., Kim H.S. Diagnostic utilities of procalcitonin and C-reactive protein for the prediction of bacteremia determined by blood culture. *Clin.Chim.Acta.* 2012; 413: 1731-6.
46. von Lilienfeld-Toal M., Dietrich M.P., Glasmacher A., Lehmann L., Breig P., Hahn C. et al. Markers of bacteremia in febrile neutropenic patients with hematological malignancies: procalcitonin and IL-6 are more reliable than C-reactive protein. *Eur.J.Microbiol.Infect.Dis.* 2004; 23: 539-44.
47. Mondal S.K., Nag D.R., Banyopadhyay R., Chakraborty D., Sinha S.K. Neonatal sepsis – Role of certain immunohematologic tests in rapid diagnosis. *J.Acad.Med.Sci.* 2012; 2: 97-100.
48. Thompson D., Milford-Ward A., Whicher J.T. The value of acute phase protein measurement in clinical practice. *Ann.Clin.Biochem.* 1992; 29(Pt.2): 123-31.
49. Shaoul R., Lahad A., Tamir A., Lamir A., Srugo I. C Reactive protein (CRP) as a predictor for true bacteremia in children. *Med.Sci.Monit.* 2008; 14(5): CR255-61.
50. McCabe R.E., Remington J.S. C-reactive protein in patients with bacteremia. *J.Clin.Microbiol.* 1984; 20: 317-9.

Поступила 17.04.19

Принята к печати 20.04.19

## ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© МАРДАНЛЫ С.Г., 2019

Марданлы С.Г.

### СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО РЫНКА МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO* В СЕКТОРЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ И ИХ НАБОРОВ

<sup>1</sup>ЗАО «ЭКОлаб, 142530, г. Электрогорск, Московская обл., Россия;

<sup>2</sup>Государственный гуманитарно-технологический университет «ГГТУ» ГОУВО Московской обл., 142611, Россия, Московская обл., г. Орехово-Зуево, Россия

*Проблема импортозамещения на Российском рынке медицинских изделий для диагностики *in vitro* (МИ<sub>ивд</sub>) не решена, несмотря на ряд мер, предпринятых правительством Российской Федерации с 2011 г. Причинами, тормозящими этот процесс, являются отсутствие современной аналитической техники отечественного производства и недостатки действующей системы регуляции обращения МИ<sub>ивд</sub> на рынке. В качестве радикальной меры, позволяющей решить проблему импортозамещения, предлагается переход от разрешительной системы регистрации МИ<sub>ивд</sub> к уведомительной.*

**Ключевые слова:** медицинские изделия для диагностики *in vitro*, рынок, регуляция обращения на рынке.

**Для цитирования:** Марданлы С.Г. Состояние и перспективы развития отечественного рынка медицинских изделий для диагностики *in vitro* в секторе диагностических реагентов и их наборов. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (7): 443-448. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-443-448>

Mardanly S.G.

CURRENT STATE AND DEVELOPMENT TRENDS OF DOMESTIC MEDICAL DEVICE MARKET FOR *IN VITRO* DIAGNOSTICS IN THE SEGMENT OF DIAGNOSTIC REAGENTS AND THEIR KITS

<sup>1</sup>CJSC EKOLab, Elektrogorsk, Moscow region, Russia;

<sup>2</sup>State Educational Institution of Higher Education of the Moscow Region. State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region, Russia

*The problem of import substitution in the Russian medical device market for *in vitro* diagnostics (MD<sub>ivd</sub>) has not been solved, despite a number of measures taken by the government of the Russian Federation since 2011. The reasons hampering this process are the lack of modern analytical equipment of domestic production and deficiencies of the current regulatory system for MD<sub>ivd</sub> circulation in the market. It is proposed the transition from licensing system of MD<sub>ivd</sub> registration to notification system as a radical measure to solve the problem of import substitution.*

**Key words:** Medical devices for *in vitro* diagnostics, medical device market, market circulation regulation.

**For citation:** Mardanly S.G. Current state and development trends of domestic medical device market for *in vitro* diagnostics in the segment of diagnostic reagents and their kits. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (7): 443-448 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-7-443-448>

**For correspondence:** Mardanly S.G., Doctor of Medical Sciences, R&D Director in CJSC EKOLab, Professor at the Department of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences; e-mail: [ekolab-president@mail.ru](mailto:ekolab-president@mail.ru)

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

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

Received 17.06.2019  
Accepted 20.06.2019

Лабораторные исследования являются неотъемлемой частью диагностики физиологических и патологических состояний организма человека различной этиологии, более 3000 лабораторных показателей, характеризующих молекулярный, клеточный, субклеточный состав проб пациентов обеспечивают более 80% всей объективной информации о состоянии организма обследуемого [2].

**Для корреспонденции:** Марданлы Сейфаддин Гашимович, д-р мед. наук, дир. ЗАО «ЭКОлаб» по науке, проф. каф. фармакологии и фармацевтических дисциплин ГГТУ; e-mail: [ekolab-president@mail.ru](mailto:ekolab-president@mail.ru)

Методы лабораторной диагностики позволяют поставить диагноз на ранней стадии заболевания, объективно оценивать эффективность проводимого лечения и благодаря этому своевременно его корректировать, затраты на разработку более совершенных методов и технологий лабораторной диагностики, на оснащение лабораторий ЛПУ современной лабораторной техникой многократно окупаются за счёт сокращения затрат на лечение [14].

Обязательной частью лабораторной диагностики являются медицинские изделия, используемые при проведении указанных исследований, т. е. медицинские изделия для диагностики *in vitro* (МИ<sub>ивд</sub>). Это особая

Таблица 1

**Производство наборов реагентов для диагностики *in vitro* по состоянию на 2016 г. [19]**

Направление	Число отечественных компаний	Доля рынка, %
Клиническая биохимия	6	40-60
Исследования гемостаза	4	60-70
Иммуноферментный анализ	6	50-60
Реагенты для гематологических анализаторов	1	30-50
ПЦР-диагностика	4	60-80
Питательные среды	5	50-60

Таблица 2

**Производство в России диагностических реагентов и их наборов [18]**

Направление	Число отечественных производителей	Объём производства, млн. руб/год
Клиническая биохимия	8	1500
Исследования гемостаза	4	500
Иммуноферментный анализ (ИФА)	6	6500
Реагенты для гематологических анализаторов	2	80
ПЦР-диагностика	4	2000
Тест-полоски для глюкометров	2	1000
Тест-полоски для анализа мочи	1	11
Микробиологические питательные среды	5	1170

категория МИ, принципиально отличающаяся от прочей продукции медицинского назначения, включая лекарственные средства и прочие МИ, поскольку МИ<sub>ивд</sub> при их использовании по целевому назначению никогда прямо или косвенно не контактируют с организмом обследуемого лица [7].

В соответствии с определениями, данными в ГОСТ Р 51088-2013 [2] и ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 [3], к МИ<sub>ивд</sub> относятся:

– диагностические реагенты или наборы реагентов – вещества природного или искусственного происхождения, необходимые для проведения соответствующих исследований;

– аналитические приборы – технические средства, позволяющие механизировать или автоматизировать проведение соответствующих исследований и учёт их результатов;

– вспомогательное оборудование – вспомогательные технические средства, облегчающие подготовку реагентов и исследуемых образцов, а также проведение исследований и учёт их результатов;

– расходные материалы, необходимые для работы аналитических приборов и вспомогательного оборудования.

Производство МИ<sub>ивд</sub> – обширная и бурно развивающаяся область медицинской промышленности. В создание новых приборов, наборов реагентов и вспомогательного лабораторного оборудования крупными зарубежными компаниями ежегодно вкладываются сотни миллионов долларов. Разработкой и производством МИ<sub>ивд</sub> занимаются такие ведущие концерны как Abbot

и Roche. В этот сектор экономики за последние время пришли такие гиганты как Siemens и Samsung [14].

По состоянию на 2014 г. мировой рынок МИ<sub>ивд</sub> оценивался как один из самых динамичных. Компании, работающие на нём, до настоящего времени имеют возможность развиваться, не вступая в острую конкурентную борьбу между собой, благодаря постоянно растущему спросу на их продукцию как со стороны государственной, так и частной медицины [1].

В России производятся все перечисленные виды МИ<sub>ивд</sub>, однако их доля на рынке далеко не всегда соответствует интересам, как разработчиков-производителей этой продукции, так и её потребителей (ЛПУ, диагностические центры, служба крови, КВД, ЦСПИД). По многим позициям на рынке МИ<sub>ивд</sub> преобладает импортная продукция [19-21].

Уровень развития отечественных производств каждой из названных групп МИ<sub>ивд</sub> различен. Наиболее развито производство наборов реагентов, хотя и здесь импортная продукция представлена внушительно (табл. 1); наименее – производство аналитических приборов; отдельные виды приборов в России не производятся вообще [20]. Исключением является производство приборов для ПЦР-анализа<sup>1</sup> [19].

Производство в России наборов реагентов и тест-систем для диагностики *in vitro* по состоянию на 2016 г. представлено в табл. 2 [18].

Ведущими отечественными производителями диагностических реагентов и их наборов являются [6, 10, 18]:

– ООО «НПФ Абрис», г. СПб; ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн», СПб; ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск; ЗАО «ДИАКОНДС», г. Пушкино Московская область (МО); ООО «ОльвексДиагностикум», СПб; ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск МО; ООО «Эйлитон», г. Москва; НПЦ «ЭКО-Сервис», г. СПб – производство наборов для биохимических исследований<sup>2</sup>.

– ЗАО «Вектор-Бест»; ООО «НПО Диагностические системы», г. Н. Новгород; ЗАО «Эколаб»; ООО «Алкор-Био», г. СПб; ООО «Хема-Медика», г. Москва; ООО «НПО Иммунотекс», г. Ставрополь – производство иммуноферментных тест-систем (ИФТС) для диагностики инфекционной и неинфекционной патологии и отдельных физиологических состояний;

– ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск МО; «Питательные среды», г. Махачкала; ЗАО НИЦФ, СПб; НПЦ «Биокомпас», г. Углич Ярославской области; ООО «Биотехновас».

<sup>1</sup>Производством оборудования для ПЦР в России занимаются «ДНК-Технология» г. Москва, Институт аналитического приборостроения, г. СПб. В год продается около 600 приборов класса «реал-тайм», по состоянию на 2013 г. в ЛПУ установлено более 3000 приборов этого класса. Рынок ПЦР оборудования поделён между четырьмя производителями: BioRad - 30%, Qiagen (RotorGene) - 30%, ДНК-Технология – 30%, Институт аналитического приборостроения (прибор АНК-32) – около 10%, т. е. на долю отечественных производителей приходится лишь около 40% продукции этого сегмента, попадающей на Российский рынок; ПЦР-анализаторы производства ДНК-Технология превосходят зарубежные аналоги по производительности и автоматизации процесса [2].

<sup>2</sup>Зарегистрировано наборов реагентов для определения более чем 50 различных биохимических анализов. Общий оборот (по расчётам производителей) около 30 млн. USD в год. ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн», ЗАО «Вектор-Бест», ЗАО «ДИАКОНДС», ЗАО «ЭКОлаб» имеют сертификаты ISO 9001, 13485 [18, 24].

ция», г. Электрогорск МО; ООО «ЦФГС», г. Москва – производство питательных сред<sup>3</sup> [21];

– НПО «Ренам» МБООИ «Общество больных гемофилией», Москва; ООО «Технология-Стандарт», Барнаул, – производство реагентов для исследования гемостаза.

«Вектор-Бест»; «ДНК-Технология», г. Протвино МО; ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва; «Литех», г. Москва – производство реагентов для ПЦР-диагностики<sup>4</sup>.

В первые постсоветские годы производство МИ<sub>ивд</sub>, как и вся отечественная фармацевтическая и медицинская промышленность, было практически разрушено, и российский рынок продукции медицинского назначения оказался заполнен импортом. Поскольку господство импорта на рынке МИ<sub>ивд</sub> было не только обременительно для того небогатого бюджета РФ и создавало прямую угрозу безопасности страны, правительство предприняло ряд мер по реанимации указанной отрасли. В феврале 2011 г. Правительством РФ утверждена Федеральная целевая программа «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» с общим объёмом финансирования 188 млрд. руб. В рамках программы предусмотрено финансирование разработки технологий и организации производства систем для клинико-диагностических исследований в объёме 6,57 млрд. руб. [12, 16].

Эти меры привели к тому, что уже в 2012 г. темп роста объёмов отечественных производств МИ<sub>ивд</sub> превысил мировые показатели [14]. Для полного исправления ситуации было явно недостаточно и такого темпа, в связи с чем, в декабре 2013 г. проведено специальное совещание Комитета Торгово-промышленной палаты РФ по предпринимательству в здравоохранении и медицинской промышленности, Комиссии Российского союза промышленников и предпринимателей (РСПП) по индустрии здоровья, Комиссии РСПП по фармацевтической и медицинской промышленности, Союза ассоциаций и предприятий медицинской промышленности, посвящённое проблемам развития отечественного производства средств для диагностики *in vitro*, на тему: «Клинико-диагностические лабораторные исследования, степень соответствия их современным стандартам лабораторной медицины. Пути развития». Проблемы отрасли рассмотрены 10. 06. 2014 г. на Научно-практической конференции «Пути повышения конкурентоспособности отечественного производства лекарственных средств и медицинских изделий. Роль фармацевтической и медицинской промышленности в удовлетворении потребности здравоохранения в жизненно необходимой и важнейшей медицинской продукции. Меры государственной поддержки» [5].

<sup>3</sup>На всех отечественных производителей приходится 183 зарегистрированные питательные среды (ФБУН ГНЦ ПМБ - 77, «Питательные среды» - 63, ЗАО НИЦФ - 36, НПЦ «Биокомпас-С» - 4, ООО «Биотехновация» - 3, ООО «ЦФГС» - 0), тогда как на иностранные компании, регистрирующие ПС списками – 2017, (Мерк (Германия) - более 200, Бектон Дикинсон (США) - более 200, Лабораторис Конда (Испания) – 227, Био Мерье (Франция) - 98) [10].

<sup>4</sup>Россия крупнейший рынок ПЦР исследований в мире (объём рынка в ценах производителей около 2 млрд. руб. в год). В РФ производится более 50 млн. ПЦР исследований в год (для сравнения в Китае их производится 30 млн. исследований в год [10].

Дал эффект и выход постановления Правительства РФ от 5 февраля 2015 г. № 102 «Об ограничениях и условиях допуска отдельных видов медицинских изделий, происходящих из иностранных государств, для целей осуществления закупок для обеспечения государственных и муниципальных нужд» [13].

Даже в наиболее продвинутом сегменте – производстве диагностических реагентов и их наборов Российские производители до сих пор не могут занять господствующие позиции на Российском рынке, т. е. до окончательного решения проблемы импортозамещения в этой области ещё далеко.

По мнению авторов, анализировавших состояние и перспективы развития российского рынка МИ<sub>ивд</sub> [1, 4, 6, 8-11, 14, 16-19], в числе причин такого положения есть две основные.

Первая – объективная, связанная с тем, что многие отечественные КДЛ оснащены зарубежными анализаторами, причём в основном анализаторами закрытого типа, позволяющими использовать их только с наборами реагентов тех же производителей и не позволяющих использовать наборы Российского производства. С 2007 г. когда появилась возможность оснащения лабораторной службы современной аналитической техникой, такую технику можно было приобрести только за рубежом. Сегодня её обладатели вынуждены использовать в работе импортные наборы реагентов, хотя, по мнению большинства экспертов, отечественные производители этой продукции в состоянии полностью обеспечить потребности рынка по большей части его номенклатуры.

Вторая – субъективная, дефекты действующей системы регулирования обращения на рынке МИ<sub>ивд</sub> вообще и МИ<sub>ивд</sub>. Эти дефекты ранее рассматривались [7], но ситуация явно требует вновь обратиться к их анализу.

Следует отметить недостатки нормативно-правового обеспечения этого обращения.

Стало уже фактически общим местом упоминание об отсутствии Федерального закона об обращении МИ<sub>ивд</sub> вообще и МИ<sub>ивд</sub> в частности и об отсутствии необходимого контакта между регуляторами рынка МИ<sub>ивд</sub> и сообществом их производителей в рамках соответствующего нормотворчества. В последнем немалую роль играет отсутствие в этом сообществе единства и отсутствие организации, представляющей и защищающей интересы всех отечественных производителей.

Отсутствие закона ведёт к тому, что обращение МИ<sub>ивд</sub> регулируется либо постановлениями Правительства РФ, либо документами Минздрава РФ, касающимися большей частью МИ<sub>ивд</sub> вообще и лишь уточняющих соответствующие нормы применительно к МИ<sub>ивд</sub>.

К этим документам есть справедливые претензии со стороны практически всех участников обращения МИ<sub>ивд</sub>.

Основной дефект всех документов – недостаточная проработанность сформулированных в них норм.

Нормы, установленные постановлением Правительства РФ № 1416 от 27. 12. 2012 г. привели к настоящему коллапсу системы регистрации всех МИ, поскольку Росздравнадзор оказался физически не в состоянии обеспечить выполнение всех предусмотренных постановлением мероприятий в заданные сроки, создали массу проблем по линии Налоговой и Таможенной служб в связи с заменой термина «изделие медицинского назначения» на термин «медицинское изделие», который в кодексах указанных служб отсутствовал, несмотря на то, что этот термин официально введён в оборот ещё 2011 г.

Федеральным законом № 323 «Об основах охраны здоровья граждан РФ».

Постановление Правительства. № 102 от 5 февраля 2015 г. «Об ограничениях и условиях допуска отдельных видов медицинских изделий, происходящих из иностранных государств, для целей осуществления закупок для обеспечения государственных и муниципальных нужд», имевшее задачу обеспечить необходимые преференции отечественным производителям, из-за недостаточной проработанности перечней МИ, допуск которых должен быть ограничен, оказалось чревато полным прекращением деятельности ряда ЛПУ поскольку поставка необходимого им оборудования блокировалась этим постановлением (доработка перечней до сих пор ещё не закончена).

Приказ МЗ РФ от 06. 06. 2012 г. № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий» ввёл номенклатурную классификацию медицинских изделий по видам и по классам в зависимости от потенциального риска их применения. Детальный анализ классификации по потенциальному риску применения применительно к МИ<sub>ивд</sub> [15], показал, что она вместо конкретного руководства по решению конкретной задачи представляет невнятный документ, использование которого практически невозможно.

Классификация построена на двух признаках «индивидуальном риске» и «риске для общественного здоровья», хотя обязательно должен учитываться ещё один признак – значимость результатов лабораторного исследования для оценки состояния обследуемого лица.

Во второй части Приложения 2 к этому приказу, где изложена указанная классификация, отсутствуют определения признаков, на которых она построена, т. е. «индивидуального риска», «риска для общественного здоровья», критериев дифференциации градаций этих признаков, т. е. отсутствует алгоритм их использования.

Приведённые в документе определения классов опасности из-за неграмотного использования союза «и/или» для связи градаций обоих рисков, позволяют дифференциацию МИ<sub>ивд</sub> только по градациям «риска для общественного здоровья» и, соответственно, в классы 2а, 2б, 3 могут включаться изделия с любым классом «индивидуального риска».

Неувязки отмечены практически во всех пунктах документа, кроме заключительных п.п. 11 и 12.

Единственным эффектом ввода этой классификации в действие является допущение крайнего субъективизма оценок классов опасности всеми заинтересованными лицами.

В связи с анализом недостатков классификации МИ<sub>ивд</sub> по «потенциальному риску их применения» необходимо отметить, что формулировка «потенциальный риск применения» – неграмотна по сути. Следует говорить о «риске неблагоприятных последствий применения».

«Риск» – термин, заимствованный из теории вероятности, в которой он используется только в сочетании с терминами «реализация/не реализация какого-то события» и означает ни больше, ни меньше как вероятность, т. е. меру возможности реализации/не реализации этого события. Если помнить об исходном смысле используемых терминов, то «потенциальный риск» – не что иное как «возможная мера возможности...», «риск применения» – не что иное как «вероятность применения». В классификации МИ<sub>ивд</sub> по классам опасности в соответствии с действующими ГОСТами ИСО «риск» трактуется как некое «сочетание вероятности причинения вреда и тяжести

этого вреда», хотя каким образом можно их «сочетать» и в каких величинах выражать это «сочетание», так и осталось секретом авторов указанных ГОСТов [15].

Большинство, если не все названные ГОСТы ИСО являются не слишком удачными переводами английских текстов соответствующих стандартов ЕЭС, которые по своей сути не что иное как заимствования из ГОСТов системы управления качеством продукции, действовавшей в СССР. Если стандарты ЕЭС отражают основные идеи системы управления качеством, разработанной в СССР, то действующие сегодня ГОСТы ИСО отражают скорее букву, нежели дух стандартов ЕЭС; на соответствующий «европейский» канцелярит накладывается и наш Российский, с массой терминов, которые являются не переводами, а транслитерацией английских, даже в тех случаях, когда имеются необходимые русские синонимы. Использование этих ГОСТов сводится к составлению соответствующей отчётной документации по образцам, заимствованным у коллег, коим удалось получить необходимые сертификаты, подтверждающие внедрение этих ГОСТов в производственную практику.

Обращаем внимание на некорректность толкования не только категории «риск».

«Класс МИ<sub>ивд</sub> по риску неблагоприятных последствий применения» – по смыслу далеко не то же самое, что ставший общепотребительным «класс опасности МИ<sub>ивд</sub>». Последнее фактически связывает последствия применения МИ<sub>ивд</sub> только с ним самим, хотя на деле неблагоприятные последствия применения (т. е. следствия ошибочное заключение по его результатам), определяются чувствительностью, специфичностью, воспроизводимостью метода, для реализации которого используется МИ<sub>ивд</sub> (именно метода, а не самого изделия, как принято записывать сейчас), способностью МИ<sub>ивд</sub> обеспечить адекватное воспроизведение этого метода при соблюдении всех требований инструкции по применению изделия (т. е. его качеством), правильностью его использования (т. е. выполнением всех требований инструкции по применению), правильностью интерпретации полученных результатов.

Поскольку при выборе «класса опасности МИ<sub>ивд</sub>» а priori допускается обязательность соблюдения требований к качеству продукта, и правил исследования, и правил интерпретации результатов, указанный класс по сути определяется только характеристиками метода исследования, т. е. на деле никакого отношения к самому изделию не имеет. Возникает вопрос, в чём смысл указанной классификации МИ<sub>ивд</sub>, тем более, что вразумительных принципов и правил её проведения не разработано до сих пор ни в РФ, ни за рубежом? Полезно создание классификации методов исследования, используемых в клинической лабораторной диагностике, по значимости результатов, получаемых с помощью этих методов для оценки состояния обследуемого лица, по их чувствительности, специфичности, воспроизводимости, а на основе этих характеристик – по рискам (т. е. вероятностям) неблагоприятных последствий ложноположительного или ложноотрицательного заключения по результатам исследования.

Основным препятствием к развитию производств МИ<sub>ивд</sub> в РФ является действующая система государственной регистрации этой продукции, её разрешительный характер.

Идея, заложенная в эту систему, предельно понятна – обеспечить доступ на Российский рынок только качественной, т. е. эффективной, безопасной для потребителя

продукцией. Применительно ко всем продуктам медицинского назначения, прямо или косвенно контактирующим с организмом пациента при своём целевом использовании, она вполне оправдана. Но МИ<sub>ивд</sub> к таким продуктам не относятся, действующая система их государственной регистрации со всеми её предрегистрационными испытаниями и экспертизами бесполезное расточительство времени и средств разработчиков-производителей и регуляторов обращения МИ<sub>ивд</sub> на рынке.

Ни двойные (технические и медицинские) испытания, ни двойные экспертизы ничего не добавляют к гарантиям эффективности и безопасности применения МИ<sub>ивд</sub>, которые представляет их разработчик, испытатели и эксперты не несут никакой ответственности за реальное качество продукта, получившего регистрационное удостоверение и поступающего на рынок.

Переход от разрешительной системы регистрации к уведомительной, сняв все искусственные барьеры на пути к рынку новых МИ<sub>ивд</sub>, позволит окончательно решить проблему импортозамещения на нём, поскольку существенное упрощение процедуры регистрации новых МИ<sub>ивд</sub> (в том числе и из сегмента аналитических приборов) создаст необходимые предпосылки для успешного внедрения на рынок соответствующих отечественных разработок и устранил причину, мешающую отечественным производителям МИ<sub>ивд</sub> из сегмента диагностических реагентов и их наборов занять на рынке место, соответствующее их потенциальным возможностям.

Такой переход возможен только при наличии необходимой нормативно-правовой базы. Первоочередным условием решения этой проблемы является разработка и принятие закона о МИ<sub>ивд</sub>, как части общего закона о МИ или как самостоятельного закона, что было бы адекватным решением, отражающим то особое положение МИ<sub>ивд</sub>, которое они занимают среди всей продукции медицинского назначения.

Если в законе будет дано однозначное определение МИ<sub>ивд</sub> (как всего класса, так и названных выше видов), исключающее возможность его произвольного толкования<sup>5</sup>, если будут прописаны условия уведомительной регистрации МИ<sub>ивд</sub>, включая требования к форме, содержанию, статусу нормативной документации на продукт, в том числе к перечню показателей, определяющих его качество<sup>6</sup>, требования к способам подтверждения характеристик МИ<sub>ивд</sub>, указанных в нормативной документации на продукт, требования к форме и содержанию документов, подтверждающих характеристики МИ<sub>ивд</sub>, указанные в нормативных документах на продукт, правила уведомления разработчиком регулятора обращения МИ<sub>ивд</sub> на рынке и правила регистрации заявленного МИ<sub>ивд</sub>, то тем самым будут созданы предпосылки для устранения всех причин, тормозящих, по мнению экспертов процесс импортозамещения на рынке этой продукции.

Переход на уведомительную регистрацию МИ<sub>ивд</sub> не должен исключать необходимость предварительного подтверждения всех заявленных показателей качества продукта, в том числе и после внесения в него каких-либо изменений. Соответствующие оценки в сторонних для заявителя учреждениях в виде испытаний, оценки материалов, представленных разработчиком-заявителем всё равно будут необходимы. Это должны быть оценки, полученные в независимых от регулятора учреждениях не связанных с регулятором. Результаты оценок при положительном их характере, т. е. при подтверждении заявленных характеристик изделия, должны стать достаточным основанием для его регистрации, либо для принятия изменений к уже зарегистрированному продукту безо всяких дополнительных экспертиз и условий.

Реального доступа к рычагам воздействия на процесс совершенствования действующей системы регуляции обращения МИ<sub>ивд</sub> на рынке у их производителей сегодня нет. Остается надеяться, что приведённые примеры несостоятельности указанной системы и доводы в пользу предлагаемых изменений будут услышаны теми, от кого зависит принятие и реализация соответствующих решений.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Виленский А., Деханова А., Буслеева А., Жуков И. Мировой рынок медицинских изделий для *in vitro*-диагностики: Россия где-то в середине. *Ремедиум. Журнал о рынке лекарств и медицинской техники.* 2014;(10): 36-9.
2. ГОСТ Р 51088-2013 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации.
3. ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 Медицинские изделия для диагностики *in vitro*. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования.
4. Итоги XIX Форума «Национальные дни лабораторной медицины России – 2015» Москва, 23-25 сентября 2015 г. <http://net.knigi-x.ru/24meditsina/601300-1-itogi-xih-foruma-nacionalnie-dni-laboratornoy-medicini-rossii-2015-moskva-sentyabrya-2015-ezhedniy.php>.
5. Калинин Ю. Т. О роли отечественной медицинской промышленности в удовлетворении потребности здравоохранения в лекарственных средствах и медицинских изделиях. *Доклад на Научно-практической конференции «Пути повышения конкурентоспособности отечественного производства лекарственных средств и медицинских изделий. Роль фармацевтической и медицинской промышленности в удовлетворении потребности здравоохранения в жизненно необходимой и важнейшей медицинской продукции. Меры государственной поддержки».* г. Москва, 10 июля 2014. <http://www.myshared.ru/slide/954539/>.
6. Кундельский Р. В. Приборы и наборы реагентов для ИФА Российского производства. <http://www.myshared.ru/slide/764512/>.
7. Марданлы С. Г. Проблемы обращения медицинских изделий для *in vitro*-диагностики. *Медицинский алфавит.* 2014; 22 (238). *Современная лаборатория.* 4; 18-20.

<sup>5</sup>Исключить ситуации, в которых у регулятора с подачи некоторых экспертов вдруг возникают сомнения в принадлежности к МИивд продукта, давно зарегистрированного как таковой имеющего европейский сертификат СЕ. Например, кровь баранья, много лет производимая ЗАО «ЭКОлаб» и, очевидно, ставшей конкурентом аналогичным незарегистрированным как МИивд продуктам, которые продаются просто как добавки к питательным средам, обогащающие их. Кровь баранья может использоваться и как обогащающая добавка к питательной среде, но её основное назначение не в этом – она является специфическим реагентом, позволяющим определять наличие или отсутствие у исследуемого микроорганизма конкретного фермента – гемолизина, т. е. это диагностический реагент, имеющий полное право считаться МИивд.

<sup>6</sup>В число показателей качества таких МИивд как диагностические реагенты должны входить только характеристики их диагностической эффективности, но не должны включаться ни технологические характеристики (состав, используемое в производстве сырьё и материалы), ни потребительские характеристики (комплектация), производитель должен иметь право вносить любые изменения в указанные характеристики при условии сохранения продуктом заявленных ранее показателей качества.

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

8. Равинская Т. Изделие номер ноль. *Vademecum*. 2016; 01. [https://vademec.ru/article/izdelie\\_nomer\\_nol/](https://vademec.ru/article/izdelie_nomer_nol/).
9. Нечаев В. Н., Манзенюк И. Н., Шипулин Г. А. и др. Российские производители медицинских изделий для диагностики *in vitro* о проблемах в отрасли. *Современная лабораторная диагностика*. 2015; 3(17): 25-9.
10. Отечественное производство средств диагностики *in vitro* состояние и перспективы развития. Ассоциация производителей средств клинической лабораторной диагностики. 2014 г. <http://www.myshared.ru/slide/946886/>.
11. Патовая ситуация сплотила производителей и потребителей медизделий. *Vademecum* 2014; 2. [https://vademec.ru/article/patovaya\\_situatsiya\\_splotila\\_proizvoditeley\\_i\\_potrebiteley\\_medizdeliy/](https://vademec.ru/article/patovaya_situatsiya_splotila_proizvoditeley_i_potrebiteley_medizdeliy/).
12. Постановление Правительства РФ от 17.02.2011 № 91 (ред. от 09.06.2016) «О федеральной целевой программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». <http://fcp.economy.gov.ru/cgi-bin/cis/fcp.cgi/Fcp/ViewFcp/View/2015/350>.
13. Постановление Правительства РФ от 5 февраля 2015 г. № 102 «Об ограничениях и условиях допуска отдельных видов медицинских изделий, происходящих из иностранных государств, для целей осуществления закупок для обеспечения государственных и муниципальных нужд».
14. Резолюция совместного заседания Комиссии РСПП по индустрии здоровья, Комиссии РСПП по фармацевтической и медицинской промышленности и Комитета ТПП РФ по предпринимательству в здравоохранении и медицинской промышленности «Состояние отечественного производства медицинских изделий для диагностики *in vitro*. Материально-техническое обеспечение лабораторной службы здравоохранения, степень соответствия современным стандартам лабораторной медицины. Пути развития» от 04.12.2013. <http://www.vrosmp.ru>.
15. Симонов В. В. О дифференциации медицинских изделий для *in vitro*-диагностики по классам их опасности. *Сборник материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации»*. Орехово-Зуево: Редакционно-издательский отдел ГГТУ; 2018.
16. Состояние и перспективы развития отечественной промышленности, производящей средства для диагностики *in vitro*. *Справочник заведующего КДЛ*. 2014; 5: 1784. [https://www.zdrav.ru/articles/101735-qqe-15-m12-sostoyanie-i-perspektivy-razvitiya-otechestvennoy-promyshlennosti?from=PW\\_F5&ustp=W](https://www.zdrav.ru/articles/101735-qqe-15-m12-sostoyanie-i-perspektivy-razvitiya-otechestvennoy-promyshlennosti?from=PW_F5&ustp=W).
17. Шибанов А. Н. Производство средств диагностики *in vitro*. Проблемы и пути развития. <http://www.myshared.ru/slide/764952/>.
18. Шибанов А. Н. Развитие отечественного производства средств клинической лабораторной диагностики. Проблемы и решения. *Доклад на Научно-образовательном форуме «Современная лабораторная медицина: инновационные технологии лабораторного анализа и новые возможности их клинического применения»* <http://www.ramld.ru/userfiles/file/Tumen%202016/ShibanovTumen.pdf>.
19. Шибанов А.Н. Стратегия развития производства средств диагностики *in vitro*. <http://unimedao.ru/files/news%202016/Shibanov.pdf>.
20. Шепелин А. П., Домотенко Л. В., Дятлов И. А., Миронов А. Ю., Алёшкин В. А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(6): 63-5.
21. Дятлов И. А., Миронов А. Ю., Шепелин А. П., Алёшкин В. А. Состояние и тенденции развития санитарной и клинической микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(8): 61-5.
- laboratornoy-medicini-rossii-2015-moskva sentyabrya-2015-ezhegodniy.php. (in Russian)
5. Kalinin Yu. T. The role of domestic medical industry in meeting the needs of health care in medicines and medical devices. *Report at the Scientific and Practical Conference "Ways to improve the competitiveness of domestic production of medicines and medical devices. The role of pharmaceutical and medical industries in meeting the health needs of vital and essential medical products. Government support measures"*. Moscow, July 10, 2014. <http://www.myshared.ru/slide/954539/>. (in Russian)
6. Kundelsky R.V. Instruments and reagent kits for Russian ELISA production. <http://www.myshared.ru/slide/764512/>. (in Russian)
7. Mardany S. G. Circulation problems of medical devices for *in vitro* diagnostics. *Meditsinskiy alfavit*. 2014; 22 (238). *Sovremennaya laboratoriya*. 4: 18-20. (in Russian)
8. Ravinskaya T. The product with number zero. *Vademecum*. 2016; 01. [https://vademec.ru/article/izdelie\\_nomer\\_nol/](https://vademec.ru/article/izdelie_nomer_nol/). (in Russian)
9. Nechaev V. N., Manzenyuk I. N., Shipulin G. A. Russian manufacturers of medical devices for *in vitro* diagnostics about problems in the industry. *Sovremennaya laboratornaya diagnostika*. 2015, 3(17), 25-9. (in Russian)
10. Domestic production of *in vitro* diagnostic tools, state and development prospects. Association of manufacturers of clinical laboratory diagnostics. 2014. <http://www.myshared.ru/slide/946886/>. (in Russian)
11. The stalemate situation united manufacturers and consumers of medical devices. *Vademecum*. 2014; 2. [https://vademec.ru/article/patovaya\\_situatsiya\\_splotila\\_proizvoditeley\\_i\\_potrebiteley\\_medizdeliy/](https://vademec.ru/article/patovaya_situatsiya_splotila_proizvoditeley_i_potrebiteley_medizdeliy/). (in Russian)
12. Resolution of the Government of the Russian Federation of 17.02.2011 No. 91 (ed. of 09.06.2016) "About federal target program "Development of the pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond". <http://fcp.economy.gov.ru/cgi-bin/cis/fcp.cgi/Fcp/ViewFcp/View/2015/350>. (in Russian)
13. Resolution of the Government of the Russian Federation of 05.02.2015 No. 102 "About restrictions and conditions of admission of certain types of medical devices originating from foreign countries for the purposes of procurement for state and municipal needs". (in Russian)
14. Resolution of the joint meeting of RSPP Commission on health industry, RSPP Commission on pharmaceutical and medical industry and RF CCI Committee on entrepreneurship on health care and medical industry "State of domestic production of medical devices for *in vitro* diagnostics. Material and technical support of the laboratory health service, the degree of compliance with modern standards of laboratory medicine. Ways of development" from 04.12.2013. <http://www.vrosmp.ru>. (in Russian)
15. Simonov V. V. Differentiation of medical devices for *in vitro* diagnostics according to their hazard classes. *Collection of materials of the V Russian scientific and practical conference with international participation "Prospects for introduction of innovative technologies in medicine and pharmacy"*. Orekhovo-Zuyev: Editorial and publishing Department of GSTU. 2018. (in Russian)
16. State and prospects of development of domestic industry producing *in vitro* diagnostic devices. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2014; 01: 1784. [https://www.zdrav.ru/articles/101735-qqe-15-m12-sostoyanie-i-perspektivy-razvitiya-otechestvennoy-promyshlennosti?from=PW\\_F5&ustp=W](https://www.zdrav.ru/articles/101735-qqe-15-m12-sostoyanie-i-perspektivy-razvitiya-otechestvennoy-promyshlennosti?from=PW_F5&ustp=W). (in Russian)
17. Shibanov A. N. Production of devices for *in vitro* diagnostics. Problems and ways of development. <http://www.myshared.ru/slide/764952/>. (in Russian)
18. Shibanov A. N. Development of clinical laboratory diagnostic production in Russia. Problems and solutions. *Report at the Scientific and educational forum "Modern laboratory medicine: innovative technologies of laboratory analysis and new possibilities of their clinical application"* <http://www.ramld.ru/userfiles/file/Tumen%202016/ShibanovTumen.pdf>. (in Russian)
19. Shibanov A. N. Development strategy for *in vitro* diagnostic production. <http://unimedao.ru/files/news%202016/Shibanov.pdf>. (in Russian)
20. Shepelin A. P., Domotenko L. V., Dyatlov I. A., Mironov A. Yu., Aleshkin V. A. Modern approaches to the problem of import substitution in the production of nutrient media. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(6): 63-5. (in Russian)
21. Dyatlov I. A., Mironov A. Yu., Shepelin A. P., Aleshkin V. A. State and development tendencies of sanitary and clinical microbiology in the Russian Federation and import substitution problem. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(8): 61-5. (in Russian)

REFERENCES

1. Vilensky A., Dekhanova A., Buslaeva A., Zhukov I. The global market of medical devices for *in vitro* diagnostics: Russia is somewhere in the middle. *Remedium. Zhurnal o rynke lekarstv i meditsinskoj tekhniki*. 2014; (10): 36-9. (in Russian)
2. GOST R 51088-2013 Medical devices for *in vitro* diagnostics. Reagents, reagent kits, test systems, control materials, nutrient media. Requirements for products and supporting documentation. (in Russian)
3. GOST R ISO 18113-1-2015 Medical devices for *in vitro* diagnostics. Information provided by the manufacturer (labeling). Part 1. Terms, definitions and general requirements. (in Russian)
4. Results of the nineteenth Forum "National Days of Laboratory Medicine in Russia – 2015" Moscow, September 23-25, 2015 <http://net.knigi-x.ru/24meditsina/601300-1-itogi-xih-foruma-nacionalnie-dni>

Поступила 17.06.19

Принята к печати 04.07.19

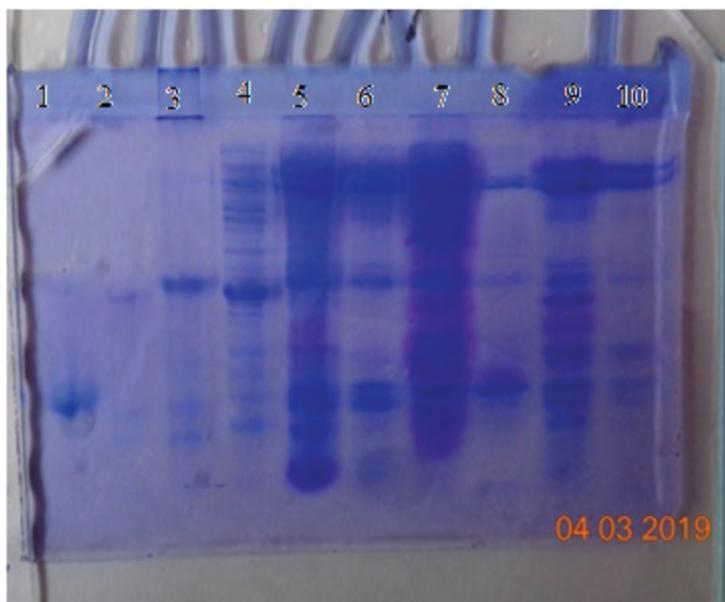


Рис.1. Электрофореграмма образцов смешанной слюны в 20% ПААГ: 1 – маркер лизоцим м.в. 14 kDa, 2, 3 – химотрипсин (маркер) м.в. 24 kDa, 4 – ИЛ-6 рекомбинантный м.в. 22 kDa, 5-10 рабочие образцы слюны: 5,7,9 – «до полоскания»; 6, 8, 10 – «после полоскания». Объем нанесения 20 мкл.

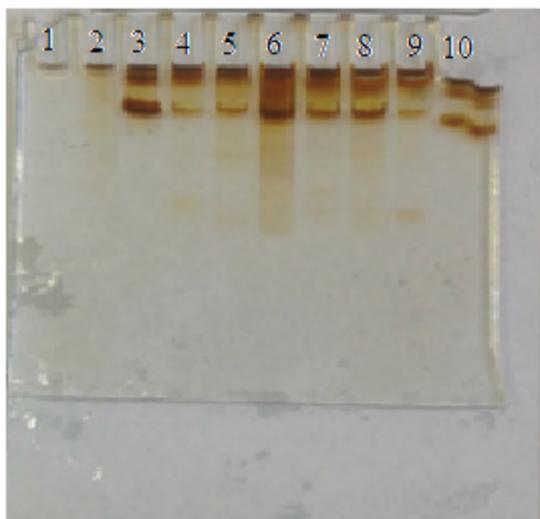


Рис.2. Электрофореграммы образцов смешанной слюны в 20% ПААГ в неденатурирующих условиях, окраска серебром. 1 - пустая дорожка; 2 - ИЛ-6 рекомбинантный, 5 мкл; 3 – ИЛ-6 коммерческий, 1мкл; 4-9 рабочие образцы слюны: 4 – волонтер «до полоскания»; 5 – волонтер «после полоскания»; 6, 8 – пациенты «до полоскания»; 7, 9 – пациенты «после полоскания»; 10 – ИЛ - 6 коммерческий, 1мкл.

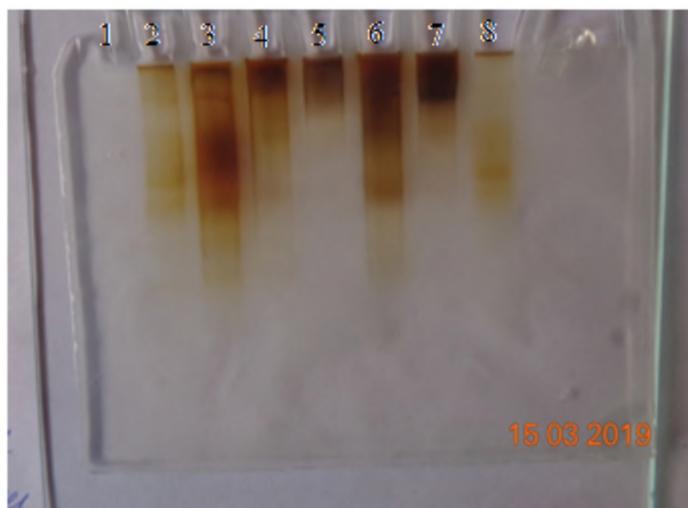


Рис. 3. Электрофореграмма образца смешанной слюны в 8% ПААГ в неденатурирующих условиях, окраска серебром: 1 - пустая дорожка; 2 – ИЛ-6 рекомбинантный 2 мкл; 3 – ИЛ-6 рекомбинантный 6 мкл; 4-7 - рабочие образцы слюны: 4 –до полоскания», 10 мкл; 5 - «после полоскания», 10 мкл; 6 - «до полоскания», 20 мкл; 7 - «после полоскания», 20 мкл; 8 – ИЛ-6 рекомбинантный 1 мкл.

# ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА ВЛАДИМИРА НИКОЛАЕВИЧА ТИТОВА



24 мая 2019 г. после непродолжительной болезни на 79-м году ушёл из жизни Главный редактор журнала «Клиническая лабораторная диагностика», руководитель лаборатории клинической биохимии и лаборатории обмена липопротеинов Института кардиологии им А. Л. Мясникова Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения России, доктор медицинских наук, профессор Титов Владимир Николаевич.

Владимир Николаевич родился в предвоенном 1940 году, рано осиротел: его отец, погиб защищая Сталинград, мать умерла. Окончил Калининский государственный медицинский институт в 1964 г. по специальности лечебное дело. После окончания аспирантуры, в 1969 г. защитил кандидатскую диссертацию на тему «Лечение и профилактика тиреотоксических кризов глюкокортикоидами» по специальности — «эндокринология», а в 1982 г. докторскую диссертацию на тему: «Особенности метаболизма липидов и липопротеинов при действии глюкокортикоидов и эстрогенов. Клинико-экспериментальное исследование» по специальности — «биохимия и кардиология».

Владимир Николаевич руководил лабораторией клинической биохимии с 1977 года, вёл активную научную и преподавательскую работу, воспитал плеяду научных кадров, сформировал теорию атеросклероза, альтернативную холестериновой и создал биологическую классификацию форм артериальной гипертензии. Он был внимательным, заботливым руководителем, человеком энциклопедических знаний.

Область научных интересов Владимира Николаевича охватывала выяснение патогенеза наиболее распространённых заболеваний человека, метаболических пандемий: атеросклероза, артериальной гипертензии, сахарного диабета, ожирения, синдрома резистентности к инсулину, метаболического синдрома, а также совершенствование патогенетически обоснованных методов диагностики в клинической биохимии.

Профессор Титов В. Н. сформулировал новую теорию транспорта в крови жирных кислот, основанную не на липидологии, а на основе химии белка, что позволило разработать теорию патогенеза атеросклероза, основу которого составляет внутриклеточный дефицит полиеновых жирных кислот. Результаты его научных исследований изложены в более чем 460 статьях и 11 монографиях, 9 изобретениях, защищённых патентами РФ.

Профессор Титов В. Н. являлся действительным членом Международного союза теоретической и прикладной химии по отделению клинической химии, Международного союза клинической химии, экспертом Всемирной организации здравоохранения по клинической химии, профессором МГУ им. М. В. Ломоносова по факультету фундаментальной медицины.

**Редакция журнала глубоко скорбит о потере прекрасного человека и главного редактора и искренне соболезнует родным и близким Владимира Николаевича.**