

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 Том 64 ЛАБОРАТОРНАЯ 12 • 2019 ДИАГНОСТИКА

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Е Ж Е М Е С Я Ч Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Ж У Р Н А Л

ДЕКАБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

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

Телефон редакции:
8-495-430-03-63,
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л. А. Шанкина

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

Художественный редактор
Е.М. Архипова

Сдано в набор 03.10.2019.
Подписано в печать 20.10.2019.
Формат 60 × 88%.
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.

Индекс 71442 — для подписчиков
Подписка через Интернет: www.aks.ru,
www.pressa-ru.ru
Подписка на электронную версию:
eLibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клини. лаб. диагностика.
2019. № 12. 705–776.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 64
12 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

DECEMBER

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

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

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief A.Yu MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRICHINA,
A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, 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 (*Sara-
tov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*),
N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MA-
VZYTOV (*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 (*Tyu-
men'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKIY
(*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA
(*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*),
A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peter-
burg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

БИОХИМИЯ

- Булгакова С. В., Тренева Е. В., Захарова Н. О., Горелик С.Г. Старение и гормон роста: предположения и факты (обзор литературы) 708
- Колотьева Н.А., Гильмиярова Ф.Н. Роль малых молекул в регуляции обмена веществ (обзор литературы)..... 716
- Гимадиев Р.Р., Ниязов А.Р., Мухин В.Е., Огурцов П.П. Диагностическая значимость циркулирующих микроРНК при неалкогольной жировой болезни печени (обзор литературы) .. 723
- Пушкин А.С., Ахмедов Т.А., Волчков В.А., Рукавишников С.А., Ким С.В. Оценка влияния гипергликемии у пациентов пожилого и старческого возраста на исходы острого коронарного синдрома 730

ЦИТОЛОГИЯ

- Базарный В.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н., Семенцова Е.А., Нерсисян П.М., Мандра Ю.В. Использование интегральных индексов в оценке буккальной цитогаммы в норме и при патологии полости рта 736

ИММУНОЛОГИЯ

- Алаторцева Г.И., Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Малинникова Е.Ю., Нурматов З.Ш., Нурматов А.З., Ташов К.Э., Касымов О.Т., Зверев В.В. Оценка доли гепатита Е в этиологической структуре острых вирусных гепатитов в отдельных регионах Кыргызстана 740
- Говорунова Т.В., Попыхова Э.Б., Широков В.Ю., Иванов А.Н. Растворимые формы адгезивных молекул в сыворотке крови в качестве маркеров эндотелиальной дисфункции при хроническом генерализованном пародонтите 747
- Караваяева Т.М., Фефелова Е.В., Максименя М.В., Путнева А.С., Федоренко Е.В., Терешков П.П. Определение некоторых показателей иммунитета и липопероксидации в ротовой жидкости у лиц с низким уровнем витамина D 753

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Годовалов А.П., Степанов М.С., Яковлев М.В., Кобзаренко Е.Е., Батог К.А. Определение биоплёнообразующей активности микроорганизмов на синтетических полимерных материалах 758

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Черанев В.В., Логинова М.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Зорина Н.А., Минаева Н.В., Парамонов И.В. Опыт внедрения метода InDel ПЦР в реальном времени для мониторинга количественного химеризма после аллогенной трансплантации костного мозга 762

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

- Долудин Ю.В., Борисова А.Л., Покровская М.С., Стефанюк О.В., Сивакова О.В., Ботоева С.А., Мешков А.Н., Метельская В.А., Драпкина О.М. Современные передовые практики и рекомендации по биобанкированию 769

BIOCHEMISTRY

- Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O., Gorelik S.G. Aging and growth hormone: assumptions and facts (review of literature)
- Kolotyeva N.A., Gilmiyarova F.N. The role of small molecules in metabolism regulation (review of literature)
- Gimadiev P.P., Niyazov A.R., Mukhin V.E., Ogurtsov P.P. The diagnostic importance of circulating microRNA for non-alcoholic fatty liver disease (review of literature)
- Pushkin A.S., Akhmedov T.A., Volchkov V.A., Rukavishnikova S.A., Kim S.V. Evaluation of hyperglycemia impact on outcomes of acute coronary syndrome in elderly and senile patients

CYTOLOGY

- Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Maksimova A.Y., Svetlakova E.N., Sementsova E.A., Nerssesian P.M., Mandra Yu.V. Use of integral indices in the assessment of buccal cytology in health and in the oral cavity pathology

IMMUNOLOGY

- Alatortseva G.I., Luhverchik L.N., Nesterenko L.N., Dotsenko V.V., Amiantova I.I., Mikhailov M.I., Kiuregian K.K., Malinikova E.Yu., Nurmatov Z.S., Nurmatov A.Z., Tashov K.E., Kasymov O.T., Zverev V.V. The estimation of the hepatitis E proportion in the etiological structure of acute viral hepatitis in certain regions of Kyrgyzstan
- Govorunova T.V., Popykhova E.B., Shirokov V.Yu., Ivanov A.N. Soluble forms of adhesive molecules in blood serum as a marker of endothelial dysfunction in chronic generalized parodontitis
- Karavaeva T.M., Fefelova E.V., Maximenya M.V., Putneva A.S., Fedorenko E.V., Tereshkov P.P. Determination of some indicators of immunity and lipoperoxidation in the oral fluid in persons with a low vitamin D level

MICROBIOLOGY

- Godovalov A.P., Stepanov M.S., Yakovlev M.V., Kobzarenko E.E., Batog K.A. Determination of biofilm forming activity of microorganisms on synthetic polymeric materials

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Cheranev V.V., Loginova M.A., Kutyavina S.S., Smirnova D.N., Zorina N.A., Minaeva N.V., Paramonov I.V. Experience introduction of quantitative analysis of chimerism after allogenic stem cell transplantation by real-time PCR with InDel polymorphisms

LABORATORY SERVICE ORGANIZATION

- Doludin Y.V., Borisova A.L., Pokrovskaya M.S., Stefanyuk O.V., Sivakova O.V., Botsoeva S.A., Meshkov A.N., Metelskaya V.A., Drapkina O.M. Current best practices and biobanking recommendations

БИОХИМИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Булгакова С. В., Тренева Е. В., Захарова Н. О., Горелик С. Г.

СТАРЕНИЕ И ГОРМОН РОСТА: ПРЕДПОЛОЖЕНИЯ И ФАКТЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

Гормон роста - мощный метаболический гормон с плейотропными эффектами, который позиционируется как «источник молодости». Соматотропин обладает многообразными функциями: стимуляция роста костей, регуляция углеводного, белкового, липидного обменов, метаболической функции печени и энергетического баланса. На клеточном уровне соматотропный гормон регулирует рост клеток, дифференцировку, апоптоз и реорганизацию цитоскелета. В обзорной статье представлены результаты актуальных исследований, отражающих взаимосвязь дефицита гормона роста или резистентности к нему с развитием старения и заболеваний, ассоциированных с возрастом, а также с увеличением продолжительности жизни.

Ключевые слова: гормон роста; инсулиноподобный фактор роста; старение; долголетие; возраст-ассоциированные заболевания.

Для цитирования: Булгакова С. В., Тренева Е. В., Захарова Н. О., Горелик С. Г. Старение и гормон роста: предположения и факты (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12):708-715.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-708-715>

Bulgakova S. V., Treneva E. V., Zakharova N. O., Gorelik S. G.

AGING AND GROWTH HORMONE: ASSUMPTIONS AND FACTS (LITERATURE REVIEW)

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

Growth hormone is a powerful metabolic hormone with pleiotropic effects, which is positioned as a “source of youth”. Somatotropin has various functions: stimulation of bone growth, regulation of carbohydrate, protein, lipid metabolism, metabolic function of the liver and energy balance. At the cellular level, somatotropic hormone regulates cell growth, differentiation, apoptosis, and cytoskeleton reorganization. The review article presents the results of topical studies that reflect the relationship of growth hormone deficiency or resistance to it with the development of aging and diseases associated with age, as well as with an increase in life expectancy.

Key words: growth hormone; insulin-like growth factor; aging; longevity; age-associated diseases.

For citation: Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O., Gorelik S.G. Aging and growth hormone: assumptions and facts (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (12): 708-715 (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-708-715>

For correspondence: Treneva E.V., Ph.D. (Medicine), assistant of the chair of geriatrics and age-related endocrinology; e-mail: eka1006@yandex.ru

Information about authors:

Bulgakova S.V., <http://orcid.org/0000-0003-0027-1786>

Treneva E.V., <http://orcid.org/0000-0003-0097-7252>

Zakharova N.O., <http://orcid.org/0000-0001-7501-830X>

Gorelik S.G., <http://orcid.org/0000-0001-5288-9874>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 24.10.2019

Accepted 29.10.2019

Интерес к влиянию старения на эндокринную систему и к омолаживающему потенциалу гормонов восходит к XIX веку и предшествует появлению эндокринологии как медицинской дисциплины. Соматотропный гормон (соматотропин, СТГ, гормон роста) был открыт в 1920 г., получен в кристаллическом виде в 1944 г. В начале 1980-х годов S.V.Asolkar и соавт. [1], используя тогда новые методы радиоиммуноана-

лиза, описали прогрессивное снижение с возрастом уровня циркулирующего СТГ.

Гормон роста представляет собой одноцепочечный белок, состоящий из 191 аминокислоты и относящийся к семейству полипептидных гормонов. Секретируется соматотрофами передней доли гипофиза в импульсном режиме в ответ на стимуляцию соматотропин-релизинг гормоном, грелином, гипо-

Для корреспонденции: Тренева Екатерина Вячеславовна, канд. мед. наук, ассистент каф. гериатрии и возрастной эндокринологии; e-mail: eka1006@yandex.ru

гликемией, пищевым белком и аминокислотами (аргинин, орнитин, лизин, глутамин). Секреция СТГ ингибируется инсулиноподобным фактором роста 1 (ИФР-1) по закону обратной связи, а также соматостатином и другими нейроэндокринными сигналами, включая инсулин, которые действуют путем связывания с соответствующими рецепторами. Хотя гормон роста является основным регулятором экспрессии ИФР-1 в печени, ИФР-1 также секретируется мезо- и эктодермальными тканями, действует аутокринно и паракринно. Также было показано, что инсулин потенцирует секрецию ИФР-1 в печени в ответ на соматотропный гормон посредством активации его рецепторов [1].

Гормон роста обладает многообразными функциями: стимуляция роста костей, регуляция углеводного, белкового, липидного обменов, метаболической функции печени и энергетического баланса. На клеточном уровне СТГ регулирует рост клеток, дифференцировку, апоптоз и реорганизацию цитоскелета. Эффекты этого белкового гормона могут быть опосредованы косвенно через инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР-1) - циркулирующий пептид, состоящий из 70 аминокислот, который вырабатывается в печени и других тканях в ответ на действие СТГ. ИФР-1-зависимые эффекты гормона роста включают регуляцию роста, углеводного и белкового обменов. Действие СТГ в тканях-мишенях может также быть прямым, независимым от ИФР-1, например стимуляция секреции инсулина, липолиз и глюконеогенез [1,2].

Свое действие СТГ реализует через рецептор, известный как рецептор гормона роста. Это единственный трансмембранный белок в тканях-мишенях, состоящий из 620 аминокислот. Связывание соматотропина с рецептором приводит к гомодимеризации рецептора, что, по-видимому, является предпосылкой биологической активности гормона, поскольку димеризация рецептора предшествует трансдукции сигнала, активации внутриклеточных сигнальных путей и экспрессии разнообразного набора генов, что позволяет СТГ проявлять свой плейотропный эффект. Однако гормон роста и инсулиноподобный фактор роста 1 действуют по-разному на метаболизм глюкозы и липидов: СТГ блокирует действие инсулина, способствует липолизу и препятствует липогенезу, тогда как ИФР-1 оказывает противоположное действие [3].

Снижение синтеза и секреции гормона роста характерны для нормального старения у всех видов млекопитающих, изученных до настоящего времени [2]. Циркулирующий пик уровней СТГ и ИФР-1 характерен для второго десятилетия жизни - времени значительной клеточной пролиферации и линейного роста, затем их концентрация прогрессивно снижается к шестому десятилетию, достигая низкого плато. Соответственно, при снижении секреции СТГ, наблюдается сопутствующее уменьшение уровней ИФР-1. Это явление называют соматопаузой. У людей, так же как и у других видов млекопитающих, с возрастом снижение активации оси СТГ / ИФР-1 коррелирует с увеличением массы тела и висцерального жира, снижением мышечной массы, физической ак-

тивности, функций иммунной системы, концентраций половых гормонов (эстрогенов и андрогенов) [4]. Таким образом, естественное снижение уровней СТГ и ИФР-1, и активности оси СТГ / ИФР-1 является причиной возрастных дегенеративных изменений. В связи с этим, в 1990 г. D.Rudman и соавт. [5] предложили рекомбинантный гормон роста человека в качестве сильнодействующего антивозрастного терапевтического средства, положительно влияющего на компонентный состав тела, минеральную плотность костной ткани и толщину кожи. Исследователи показали, что введение рекомбинантного СТГ в течение 6-ти мес возвращает изменения мышечной массы тела и массы жировой ткани к уровням, характерным для людей более молодого возраста, в среднем на 10–20 лет назад. Эти данные вызвали ажиотаж вокруг рекомбинантного гормона роста, как антивозрастного средства, а некоторые сторонники провозгласили его «источником молодости». Врожденный дефицит СТГ, который сопровождается карликовостью, по данным М.А.Papadakis и соавт. [6], значительно снижает среднюю продолжительность жизни. Эти данные привели к многочисленному использованию гормональной терапии в качестве антивозрастной.

Нет сомнений в том, что введение заместительной гормонотерапии лицам с дефицитом соматотропина важно для здоровья. Тем не менее, нет достоверных данных относительно пользы восстановления «молодых» уровней гормона роста эндокринологически здоровым стареющим людям. Таким образом, возникает дискуссия о том, можно ли считать это снижение в целом полезным или вредным для старения и связанных с возрастом заболеваний. Доказано, что аномально высокие уровни СТГ, характерные для акромегалии, увеличивают заболеваемость и смертность как у грызунов, так и у людей [7-9]. Однако полученные данные о влиянии восстановленного уровня СТГ не раскрывают всех возможных эффектов повышения уровней СТГ на старение и прогрессирование возраст-ассоциированных заболеваний. Несмотря на то, что преимущества введения СТГ разнообразны и хорошо документированы, также очевидно, что не все клинические результаты восстановления уровня гормона роста являются благоприятными. Так сообщается, что даже низкие дозы рекомбинантного СТГ увеличивают риск нарушения углеводного обмена, развития сахарного диабета и смертность [10]. В 2007 г. метаанализ использования рекомбинантного СТГ у пожилых людей (средний возраст 69 лет) показал, что препарат имеет незначительные преимущества для состава тела, но имеет большие риски развития сахарного диабета [10,11].

В то же время было показано, что снижение активности оси СТГ/ИФР-1 продлевает продолжительность жизни у широкого спектра видов, включая червей, плодовых мух, дрожжей и мышей [12]. Ограничение калорийности, которое является одним из наиболее действенных способов увеличения продолжительности жизни у большинства видов, также снижает активность оси СТГ в ИФР-1 [12]. Некоторые исследования также подтверждают увеличение продолжительности жизни у людей при уменьшении

уровней СТГ и ИФР-1 [13,14]. Результаты подобных исследований поднимают вопрос о том, может ли пониженная активность оси СТГ/ФР-1 быть полезной для увеличения продолжительности жизни человека.

Таким образом, две концепции, а именно, высокие или низкие уровни гормона роста и ИФР-1 замедляют старение и увеличивают продолжительность жизни, находятся в центре внимания современных ученых.

Много новой информации об эффектах соматотропина дали исследования трансгенных мышей-гигантов, которые были получены в нескольких лабораториях с использованием тогда новой процедуры инъекции клонированных ДНК, кодирующих высокую выработку гормона роста в пронуклеусы зигот мышей [15]. Поскольку экспрессия гормона стимулировалась такими промоторами, как металлотионеин I или фосфоенолпируваткарбоксикиназа, СТГ у этих мышей вырабатывался в больших количествах в течение всей жизни в разных органах и тканях, прежде всего в печени, почках и кишечнике. [16]. Кроме того, скорость секреции СТГ не подчиняется контролю ИФР-1 и закону отрицательной обратной связи. Учитывая анаболический, диабетогенный и липолитический эффекты гормона, трансгенные мыши были очень худыми и оставались такими в течение всей жизни, в отличие от мышей дикого типа. Удивительный гигантский фенотип трансгенных мышей привлек внимание ученых, в связи с чем эти животные использовались и продолжают использоваться в многочисленных исследованиях действия СТГ [15]. В ходе экспериментов было замечено, что для трансгенных мышей характерна сниженная продолжительность жизни примерно на 30-40% по сравнению с мышами дикого типа [16,17]. Многие физиологические характеристики этих животных поразительно напоминают симптомы старения у генетически нормальных мышей: кифоз, раннее снижение когнитивной функции и обмена гипоталамических нейротрансмиттеров, поседение волос, повышенную заболеваемость раком [18]. Кроме того, антиинсулиновая активность СТГ приводит к высоким уровням инсулина и развитию инсулинорезистентности у трансгенных мышей. Таким образом, сочетание резистентности к инсулину и гистопатологических изменений в органах и тканях является вероятной причиной преждевременной смерти этих животных.

Доказано, что синдром акромегалии, развивающийся у людей в результате чрезмерного производства СТГ аденомой передней доли гипофиза (соматотропиномой), связан с повышенным риском гипертонии, сахарного диабета и рака, а также с уменьшением продолжительности жизни [19], что в совокупности можно рассматривать как признаки ускоренного старения. Однако следует отметить, что ускорение нормального старения очень трудно отличить от различных патологических процессов, связанных с высоким уровнем СТГ у трансгенных животных и у пациентов с акромегалией или гигантизмом. Именно поэтому вышеописанные эффекты гормона роста обычно не принимаются как доказательства того, что высокие уровни СТГ способствуют старению. Однако, несмотря на различия во мнениях относительно интерпре-

тации этих результатов, они, несомненно, поднимают вопрос о том, может ли концентрация СТГ у здорового, т.е. не подвергшегося генетическим мутациям, человека, играть какую-либо роль в контроле старения и долголетия. На этот вопрос окончательно ответила демонстрация того, что мыши, лишённые гормона роста или рецепторов к нему, имеют значительное увеличение продолжительности жизни и множественные симптомы замедленного старения.

Первые сообщения о старении и продолжительности жизни гипопитуитарных карликовых мышей, у которых отсутствовали соматотрофы, появились в 1970-х годах, но полученные данные были противоречивы в отношении их продолжительности жизни: от сокращения [20], нормальной продолжительности [21] до значительного увеличения [22].

Интересно исследование других мутантных мышей Ames dwarf (Prop1^{dw}) и Snell dwarf (Pit1^{dw}), с отсутствием вследствие мутации белков Pit 1 и Prop-1, необходимых для дифференциации гормон-специфических типов клеток в передней доли гипофиза. У обоих типов гомозиготных мышей-мутантов отсутствовали клетки, продуцирующие СТГ, пролактин и тиреотропный гормон, что приводило к дефициту этих трех гормонов. В связи с этим, мыши Ames и Snell имели сходные фенотипы: карлики, характеризующиеся женской стерильностью, сниженными уровнями инсулина, ИФР-1, глюкозы и гормонов щитовидной железы. Оба этих штамма мышей демонстрировали увеличение продолжительности жизни более чем на 40% [23].

Гипотеза о том, что увеличение продолжительности жизни у этих мутантов обусловлено отсутствием сигналов СТГ, была впоследствии подтверждена демонстрацией того, что мыши с СТГ-резистентностью из-за делеции рецептора гормона роста и мыши с изолированным дефицитом соматотропина являются также долгоживущими [18]. Так, мыши Ghr - / -, у которых нарушен ген рецептора СТГ, также известны как мыши Laron, что является сходным с синдромом Ларона человека. Мыши, гомозиготные по этой делеции, рождаются нормального размера, но достигают менее 50% взрослого веса особей дикого типа. Мыши Ghr - / - имеют более высокие, чем обычно, уровни СТГ, но очень низкие уровни ИФР-1, примерно 20% от таковых у контрольных мышей. Кроме того, у них концентрация глюкозы натощак и уровень инсулина снижаются на протяжении всей жизни, возрастные изменения когнитивной функции и костно-мышечной системы, риски развития рака отсрочены и/или уменьшены [16]. Несмотря на то, что мыши Ghr - / - имеют нормальную чувствительность к инсулину, они страдают ожирением, что в основном связано с повышенным накоплением подкожной жировой ткани. [16]. Анализ кривых выживаемости мышей Ghr - / - показал, что уровень их смертности - наиболее значимый показатель старения, и у этих мутантов он ниже, чем у мышей без мутаций [24]. Средняя продолжительность жизни самок и самцов мышей Ghr - / - была на 21 и 40% соответственно больше, чем у контрольных мышей дикого типа. В отличие от контрольных мышей дикого типа и мышей-карликов Ames, ограниче-

ние калорий не увеличивало срок жизни мышей *Ghr* - / -, что подтверждает гипотезу о том, что ось СТГ/ИФР-1 и ограничение калорий могут иметь сходные механизмы увеличения продолжительности жизни.

Тем не менее, описан интересный факт, что не все мыши с пониженным уровнем СТГ или ИФР-1 демонстрируют увеличение продолжительности жизни. Мыши, у которых увеличен уровень антагониста гормона роста (ГНА), представляют такой пример [25]. Мыши ГНА экспрессируют молекулу, которая конкурирует с эндогенным СТГ за связывание с рецептором гормона роста и приводит к заметному снижению СТГ-индуцированной внутриклеточной передачи сигналов, и, как следствие, эти мыши являются карликовыми и имеют пониженные уровни ИФР-1 и СТГ [24, 25]. В отличие от ранее обсуждавшихся мутаций, с уменьшением передачи сигналов СТГ / ИФР-1, у мышей ГНА, не наблюдается увеличения продолжительности жизни по сравнению с контрольной группой [25]. Эта мутация является интересным исключением из ранее упомянутых. То есть мыши ГНА являются карликовыми, имеют низкий СТГ и сопутствующее снижение ИФР-1, но не демонстрируют увеличения продолжительности жизни. Тем не менее, существует несколько ключевых фенотипических различий, помимо продолжительности жизни между ГНА и *Ghr* - / - мышами. Так, снижение уровня ИФР-1 у мышей ГНА менее выражено по сравнению с *Ghr* - / - на 20-25 и 80%, соответственно [24]. Другими поразительными различиями между мышами *Ghr* - / - и ГНА являются увеличение веса и степень чувствительности к инсулину. Так, трансгенные мыши ГНА, карликовые в ранние месяцы, в конечном итоге набирают вес, который приближается к весу контрольной группы, имеют инсулинорезистентность, тогда как *Ghr* - / - остаются карликовыми и с высокой чувствительностью к инсулину даже у старых мышей [24].

У людей резистентность или нечувствительность к СТГ, также известная как синдром Ларона, вызвана гомозиготными мутациями в рецепторе к гормону роста или СТГ-индуцированных внутриклеточных сигнальных молекулах. Z.Laron и соавт. [26] с 1958 г. изучали когорту из 60 пациентов. Рост пациентов колебался от 108 см до 142 см, они с раннего детства страдали ожирением, у некоторых пациентов наблюдалось нарушение метаболизма гликемического обмена.

Данных о продолжительности жизни этой когорты нет, в связи с тем, что многие пациенты были пролечены рекомбинантным ИФР-1, и большинство пациентов все еще живы [22].

У взрослых этиология дефицита СТГ может быть различной, но чаще всего развивается в результате опухолей передней доли гипофиза или является результатом их лечения, либо представляет собой последствие черепно-мозговой травмы. Многочисленные исследования предоставили доказательства того, что дефицит гормона роста у взрослых ассоциируется с ожирением, снижением мышечной массы и минеральной плотности костной ткани, а также с ухудшением общего самочувствия и качества жизни [27, 28]. Симптомы дефицита СТГ у взрослых на-

поминают изменения в составе тела, когнитивной и сексуальной функциях, которые обычно сопровождаются старением. Это сходство вместе с доказательством того, что уровни гормона роста постепенно снижаются в течение взрослой жизни, привело к интересу к использованию соматотропина для уменьшения или устранения нежелательных эффектов старения [29]. Однако результаты последующих исследований показали побочные эффекты терапии рекомбинантным СТГ [30].

После сообщения об увеличении продолжительности жизни у карликовых мышей Ames [18], многие исследователи направили свои усилия на выявление механизмов, ответственных за более медленное старение этих и других связанных с СТГ мутаций. Поскольку окислительный стресс и митохондриальная генерация активных форм кислорода (АФК) и связанное с ними окислительное повреждение различных клеточных компонентов уже давно утвердились в качестве важного и, возможно, ключевого механизма старения, большое количество работ было направлено на исследование этой системы у карликовых мышей Ames и других долгоживущих мышей-мутантов. Работа лаборатории Brown-Borg Н.М. (Университет Северной Дакоты, США) предоставила доказательства того, что карликовые мыши Ames вырабатывают меньше АФК, обладают более высокой активностью антиоксидантных ферментов, таких как каталаза, медно-цинковые и марганцевые супероксиддисмутазы в почках, печени, сердце и гипоталамусе, а также меньше подвержены окислению белков липидов и, что очень важно, ядерной и митохондриальной ДНК [31, 32]. Биологическая значимость хорошей антиоксидантной защиты у этих животных была подтверждена последующими исследованиями, которые показали, что карликовые мыши Ames обладают большей устойчивостью к параквату - токсическому соединению, вызывающему сильный окислительный стресс в легких и других органах [33]. Снижение выработки АФК можно рассматривать как свидетельство повышения эффективности функции митохондрий. В более поздних исследованиях описаны органоспецифические различия между карликом Эймс и нормальными мышами в экспрессии и активности различных компонентов митохондриальной цепи переноса электронов, а также в экспрессии и активации PGC1 α , ключевого регулятора митохондриальной функции у мышей с мутациями, связанными с СТГ, дают вероятное объяснение различий энергетического метаболизма животного, выявленного непрямой калориметрией, и могут быть связаны у них с улучшением термогенеза [33].

Ассоциация долголетия с устойчивостью к стрессу была установлена у червей, плодовых мух и мышей [34, 35]. Клеточный стресс может быть вызван различными внеклеточными или внутриклеточными стимулами, такими как тепло, гипоксия, облучение, депривация глюкозы и накопление активных форм кислорода [34]. Чтобы избежать повреждения органелл и ДНК, а также агрегации белков, клетка может реагировать на стресс, активируя механизмы выживания, такие как аутофагия, или индуцируя апоптоз [34].

Различные стрессовые стимулы ингибируют mTOR, субъединицу внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов, «мишень рапамицина», способствуя росту, метаболизму и выживанию клеток в условиях избытка питательных веществ [36]. Длительная активация mTOR может вызвать клеточный стресс через накопление развернутых белков и АФК, а также истощение стволовых клеток [36]. Ингибирование mTOR рапамицином, ограничение калорий или снижение передачи сигналов СТГ / ИФР-1 стимулирует аутофагию и, как полагают, приводит к улучшению реакции на клеточный стресс и увеличению продолжительности жизни беспозвоночных. Способность противостоять различным воздействиям окружающей среды также связана с более медленным или отсроченным старением у млекопитающих [34]. Доказательства повышенной стрессоустойчивости долгоживущих карликовых мышей не ограничиваются выживаемостью после получения сублетальной или летальной дозы параквата [32]. Дермальные фибробласты, выделенные у карликов Ames и других долгоживущих СТГ-связанных мутантов, более устойчивы в культуре клеток к различным цитотоксическим агентам, депривации глюкозы и индукторам окислительного повреждения по сравнению с фибробластами, полученными у генетически нормальных животных [34]. Пациенты с синдромом Ларона (экваторская когорта) также показывают снижение передачи сигналов, вызванных стрессом. Это открытие было исследовано путем сравнения результатов инкубации человеческих эпителиальных клеток с сывороткой от этих пациентов или с сывороткой их здоровых родственников. Сыворотка пациентов вызывала увеличение экспрессии SOD2 и снижение уровней мРНК mTOR. После обработки H_2O_2 клетки, обработанные сывороткой пациента, показали меньший разрыв ДНК [26].

Для мышей с дефицитом СТГ и СТГ-резистентных популяций характерны гипoinsулинемия с пониженным или «нормально низким» уровнем глюкозы и отсутствие инсулинорезистентности [24]. Исследования интерактивных эффектов «генов долголетия» и ограничения калорий выявили тесную связь между чувствительностью к инсулину и продолжительностью жизни [16]. У GHR - / - мышей изменения в экспрессии генов, связанных с передачей сигналов инсулина и активации рецептора инсулина, являются органоспецифичными [24]. Хотя чувствительность к инсулину не одинаково связана с продолжительностью жизни у различных мутантных и трансгенных мышей, C.Selman [36] считает, что у мутантов, связанных с СТГ, высокая чувствительность к инсулину - важный механизм более медленного и здорового старения. Необходимо подчеркнуть, что повышенная чувствительность тканей к инсулину также была связана с долголетием человека, особенно ярким примером являются исследования людей из долгоживущих семей [37]. Кроме того, умеренное снижение уровня инсулина и заметное улучшение чувствительности тканей к инсулину вместе со снижением систолического артериального давления представляют собой физиологическую ситуацию, прямо противополож-

ную метаболическому синдрому - состоянию, связанному с повышенным риском возрастных хронических заболеваний и снижением продолжительности жизни [35]. Противоположный эффект реализуется при высокой чувствительности тканей к инсулину, а также при сниженной секреторной способности β -клеток поджелудочной железы у гипопитуитарных карликов и GHR - / - мышей, что может быть связано непосредственно с отсутствием сигналов СТГ и известных эффектов соматотропина на ткани-мишени инсулина и на развитие островков поджелудочной железы [37].

Повышенная концентрация адипонектина, пониженные уровни провоспалительных цитокинов в крови и резистентность mTOR, особенно mTORC1, представляют важные механизмы улучшения передачи сигналов инсулина у СТГ-дефицитных и СТГ-резистентных мышей [38]. Интересно, что каждый из этих механизмов участвует в контроле здорового старения и долголетия с помощью механизмов, не связанных напрямую с чувствительностью к инсулину. Так, адипонектин обладает противовоспалительным и антиатерогенным действием, при этом доказано, что хроническое воспаление даже слабой степени является ключевым механизмом старения и ключевым фактором риска для многих возрастных заболеваний. Мишень рапамицина или гомологичной передачи сигналов является важным регулятором старения у организмов, начиная от дрожжей и червей и заканчивая насекомыми и млекопитающими [38]. Лечение рапамицином подавляет активность mTOR и увеличивает продолжительность жизни у мышей, снижая риск развития рака, однако чувствительность к инсулину скорее снижается, чем улучшается, по крайней мере, на начальном этапе [39]. У мышей GHR - / - и карликовых мышей Ames здоровому старению и увеличению продолжительности жизни способствуют увеличения уровня адипонектина и высокая чувствительность к инсулину, низкие уровни IL-6, передача сигналов mTOR и воспаление гипоталамуса, что характерно для худеющих фенотипов, ограничения калорий. Удивительно, что у СТГ-связанных мутантов эти характеристики сосуществуют с ожирением [40]. Этот парадокс был изучен в исследованиях, связанных с хирургическим удалением внутрибрюшных (висцеральных) жировых отложений [41]. Результаты показали, что по сравнению с нормальными животными висцеральная жировая ткань мутантов продуцирует меньше TNF α и IL-6 и больше адипонектина и, таким образом, способствует повышению чувствительности к инсулину, а не резистентности к нему [41].

Особого внимания заслуживает влияние врожденного дефицита СТГ на воспаление и иммунную систему. Хотя действия СТГ часто описываются как противовоспалительные [4], СТГ-дефицитные и СТГ-резистентные мыши характеризуются сниженной экспрессией провоспалительных цитокинов в жировой ткани, в гипоталамусе и в других областях головного мозга, снижением активации NLRP3-воспаления, снижением гипоталамического астроглиоза и повышением уровня адипонектина [4, 27]. Этот переход от про- к противовоспалительному профилю наверняка способствует здоровому старению и увеличению про-

должительности жизни этих мутантов. Причинная роль «воспаления» в развитии заболеваний и снижении продолжительности жизни хорошо изучена, и исследования в лаборатории D. Cai, ученые которой предоставили убедительные доказательства того, что воспаление гипоталамуса способствует старению мышей [35].

У карликовых мышей Ames и Snell подавлен ряд параметров иммунной системы [20], напоминающих нормальных животных, находящихся на гипокалорийной диете. Это, вероятно, представляет собой сдвиг в распределении энергии, получаемой из пищи, в сторону других энергетически емких процессов и, в частности, термогенеза [35]. Эти животные демонстрируют нормальную выработку антител в ответ на воздействие инфекционных агентов и задержку в иммуносенесценции - старении иммунных клеток [4].

Доказано, что повышенные уровни СТГ и ИФР-1 у млекопитающих связаны с развитием рака молочной железы и толстой кишки. Так, у СТГ-трансгенных мышей чаще встречаются онкологические заболевания. [25]. Кроме того, у людей с акромегалией, ряд исследователей отмечают увеличение заболеваемости раком толстой кишки, хотя общее увеличение частоты опухолей у этих пациентов не подтверждено. У мышей Ames, Snell Ghr - / -, характеризующихся низким уровнем соматотропина и / или ИФР-1, доказана меньшая онкозаболеваемость [26]. Исследования на людях соответствуют результатам биологических экспериментов на мышах: опухоли практически отсутствуют у пациентов с синдромом Ларона [26].

Ингибирование mTOR рапамицином или ограничение калорийности повышает устойчивость к опухолям и увеличивает продолжительность жизни у разных видов [39].

Существуют убедительные доказательства того, что рост взрослой особи - это СТГ- и ИФР-1-зависимый признак, отрицательно связанный с продолжительностью жизни домашних собак - вида, в котором при селекции наблюдается поразительный, более чем в 100 раз, диапазон различий в размере тела [42]. Аналогичная взаимосвязь размеров тела и продолжительности жизни была также отмечена у лабораторных крыс, домашних кошек [43] и лошадей [44]. Отношение роста к долголетию у людей менее очевидно, и часто описывается как спорное. Тем не менее, существует множество примеров, когда низкорослые люди жили дольше, чем люди более высокого роста из той же группы населения. Результаты исследования долголетия американских мужчин японского происхождения показали значительно большую продолжительность жизни у более низкорослых [19]. Важно, что данный факт был связан с уровнями инсулина, инсулинорезистентностью, которые, как ранее было доказано, связаны с семейным долголетием, а также с гетерогенностью *FOXO3* - гена с хорошо доказанной связью с долголетием в различных популяциях людей [2, 13, 29]. Кроме того, продолжительность жизни человека связана с циркулирующими уровнями ИФР-1 и с полиморфизмом в гене, кодирующем рецепторы ИФР-1 [3].

Другие механизмы, которые, как считается, связывают снижение уровня соматотропина с медленным

старением, включают в себя регулирование энергетического метаболизма для увеличения окисления жирных кислот и митохондриальной эффективности, повышение уровня гуманина - продукта выработки митохондрий, который регулирует клеточные реакции на стресс, увеличение популяции стволовых клеток, снижение частоты мутаций, что означает улучшение поддержания генома и значительные изменения в профилях экспрессии генов, включая экспрессию микро-РНК [32, 33].

Таким образом, рассмотренные выше исследования представили четкие доказательства того, что у лабораторных мышей снижение уровня СТГ или соматотропин-резистентность способствует устойчивости к стрессу, здоровому старению и значительному увеличению продолжительности жизни. Но, тем не менее, эти данные противоречивы, поскольку четко доказано, что именно снижение уровня СТГ с возрастом так или иначе способствует старению и сокращению продолжительности жизни.

Многие из физиологических действий гормона роста опосредованы ИФР-1, который также играет ключевую роль в контроле отрицательной обратной связи экспрессии СТГ. Циркулирующие уровни ИФР-1 регулируют степень секреции и активности соматотропина. Неудивительно, что связанное с возрастом снижение секреции гормона роста связано с общим параллельным, хотя и менее выраженным, снижением уровней ИФР-1 в плазме [19]. Оценка функциональных и патологических последствий сопутствующего снижения уровней СТГ и ИФР-1 осложняется тем фактом, что некоторые действия гормона роста опосредованы ИФР-1, некоторые - нет. Более того, эффекты СТГ и ИФР-1 на один и тот же процесс или ткань-мишень могут быть различными, а в некоторых случаях даже противоположными. Например, соматотропин является липолитическим, а ИФР-1 - нет, СТГ способствует повышению инсулинорезистентности, в то время как ИФР-1 снижает ее и имитирует различные эффекты инсулина [45].

Сложность в интерпретации эффектов действия СТГ, с точки зрения результирующих изменений уровней ИФР-1, связана с различиями в регуляции экспрессии ИФР-1 в различных органах. Хотя экспрессия ИФР-1 в печени, основном источнике циркулирующего ИФР-1, явно СТГ-зависимая, экспрессия ИФР-1 в других тканях нет. У мышей с делецией рецепторов СТГ во всех тканях экспрессия ИФР-1 в печени снижена значительно, в почках - умеренно понижена, а в сердце и мозге - не изменена. В результате, как у СТГ-дефицитных, так и у СТГ-резистентных мутантов, существенное подавление уровней ИФР-1 в плазме сосуществует с поддержанием нормальной или повышенной экспрессии ИФР-1 в разных областях головного мозга [46]. Анализ локальной тканеспецифической экспрессии и активности ИФР-1 важен для расшифровки фенотипических последствий измененной передачи сигналов СТГ, включая ее влияние на продолжительность жизни. Исследования на животных с делецией PAPP-A-протеазы, которая расщепляет ИФР-1-связывающие белки, представили важные доказательства роли локальной (тканевой)

доступности биологически активного ИФР-1 в контроле старения и долголетия [45].

Считается, что аналогично возрастному снижению уровня соматотропина, снижение уровней ИФР-1 вызывает или способствует функциональному дефициту, который развивается при старении. Исследования на экспериментальных животных и на клеточных культурах предоставили очень убедительные доказательства нейропротективного и кардиопротективного действия ИФР-1 [45]. Более того, эпидемиологические исследования показывают, что высокие уровни ИФР-1 увеличивают риск развития и прогрессирования рака, однако снижают риск развития когнитивных дисфункций, деменции и сердечно-сосудистых заболеваний [45].

Однако исследования в этой области также не лишены противоречий. Сообщалось, что результаты тканеспецифической делеции рецепторов ИФР-1 в сердце и в центральной нервной системе предотвращают, а не ускоряют различные возрастные изменения [35]. Уменьшение передачи сигналов инсулина/ИФР-1 (IIS) или гомологичных сигнальных путей задерживает старение и увеличивает продолжительность жизни организмов, начиная от дрожжей и до мышей, вероятно, путем подавления активности mTOR и снижения ингибирующей цитоплазматической секвестрации факторов транскрипции семейства FOXO [38]. Доказательства существования «двухфазной» (U-образная) взаимосвязи между уровнями ИФР-1 и продолжительностью жизни, как высокий, так и низкий уровень ИФР-1 увеличивал смертность от возраст-ассоциированных заболеваний у мышей [25], может объяснить некоторые, казалось бы, противоречивые результаты.

Таким образом, понимание роли соматотропной оси - СТГ/ИФР-1 в контроле старения млекопитающих еще далеко до завершения, а интерпретация многих исследований остается спорной.

В будущих исследованиях, вероятно, будет определено, может ли незначительное или временное снижение активности соматотропной оси с помощью пищевых или фармакологических средств оказать благотворное влияние на продолжительность жизни и риск возникновения связанных с возрастом заболеваний у человека. Учитывая плейотропные эффекты оси СТГ и ИФР-1, также вероятно, что избирательное манипулирование только несколькими, или, возможно, единственной, мишенями соматотропной оси, может быть более эффективным, чем уменьшение секреции или резистентности соматотропина для долголетия. Текущие и будущие клинические исследования, несомненно, определят, может ли терапия рекомбинантным СТГ помочь людям, страдающим саркопенией или другими проявлениями синдрома «хрупкости», и определить показания для такого лечения.

Тем не менее, на настоящий момент бесспорными остаются следующие факты:

Соматотропин – мощный метаболический гормон с плейотропными эффектами, который позиционируется как «источник молодости».

Наблюдается четкое возрастное снижение как СТГ, так и ИФР-1, называемое соматопаузой.

Рекомбинантный человеческий гормон роста и ИФР-1 являются утвержденными терапевтическими

средствами для пациентов с дефицитом соматотропина или первичным дефицитом ИФР-1 соответственно; подобная терапия не может быть применима у эндокринологически здоровых пожилых.

У лабораторных мышей дефицит СТГ или резистентность к нему ассоциируется с отсроченным началом старения и снижением заболеваемости, связанной с возрастом, и значительным увеличением продолжительности жизни.

Необходимы дальнейшие исследования для изучения влияния оси СТГ/ИФР-1 на продолжительность жизни и связь с возраст-ассоциированными заболеваниями у людей и поиска возможных на нее воздействий.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Asolkar S.V., Sivaprasad N., Deshpande A., Shah K.B., Mani R.S. Radioimmunoassay of human growth hormone and its application in pituitary dysfunction studies. *J. Radioanal. Chem.* 1981; 65(1–2): 297–305.
2. Bartke A. Somatic growth, aging, and longevity. *NPJ Aging Mech Dis.* 2017; 29: 3–14.
3. Anisimov V.N., Bartke A. The key role of growth hormone-insulin-IGF -1 signaling in aging and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2013; 87(3): 201–23.
4. Bodart G., Farhat K., Charlet-Renard C., Salvatori R., Geenen V., Martens H. The somatotrope growth hormone-releasing hormone/growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis in immunoregulation and immunosenescence. *Front. Horm. Res.* 2017; 48: 147–59.
5. Rudman D., Feller A.G., Nagraj H.S. Gergans G.A., Lalitha P.Y., Goldberg A.F. et al. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. *N. Engl. J. Med.* 1990; 323(1): 1–6.
6. Papadakis M.A., Grady D., Black D. Growth hormone replacement in healthy older men improves body composition but not functional ability. *Ann. Intern. Med.* 1996; 124(8):708–16.
7. Duran-Ortiz S., Brittain A.L., Kopchick J.J. The impact of growth hormone on proteomic profiles: a review of mouse and adult human studies. *Clin. Proteomics.* 2017; 14: 24.
8. François J.C., Aïd S., Chaker Z., Lacube P., Xu J., Fayad R. et al. Disrupting IGF signaling in adult mice conditions leanness, resilient energy metabolism, and high growth hormone pulses. *Endocrinology.* 2017; 158(7): 2269–83.
9. Sun L.Y., Fang Y., Patki A., Koopman J.J., Allison D.B., Hill C.M. et al. Longevity is impacted by growth hormone action during early postnatal period. *Elife.* 2017; 6: e24059.
10. De Mello-Coelho V., Cutler R.G., Bunbury A., Tammara A., Mattson M.P., Taub D.D. Age-associated alterations in the levels of cytotoxic lipid molecular species and oxidative stress in the murine thymus are reduced by growth hormone treatment. *Mech. Ageing Dev.* 2017; 167: 46–55.
11. Clemmons D.R. Growth hormone should be used only for approved indications. *Clin. Endocrinol. Metab.* 2014; 99(2): 409–11.
12. Bartke A., List E.O., Kopchick J.J. The somatotropic axis and aging: Benefits of endocrine defects. *Growth Horm. IGF Res.* 2016; 27: 41–5.
13. Bartke A. Can growth hormone (GH) accelerate aging? Evidence from GH-transgenic mice. *Neuroendocrinology.* 2003; 78(4): 210–6.
14. Bartke A., Darcy J. GH and ageing: pitfalls and new insights. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017; 31(1): 113–25.
15. Rollo C.D., Carlson J., Sawada M. Accelerated aging of giant transgenic mice is associated with elevated free radical processes. *Canadian Journal of Zoology.* 1996; 74: 606–20.
16. Darcy J., McFadden S., Bartke A. Altered structure and function of adipose tissue in long-lived mice with growth hormone-related mutations. *Adipocyte.* 2017; 6(2): 69–75.

17. Masternak M.M., Darcy J., Victoria B., Bartke A. Dwarf mice and aging. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2018; 155: 69-83.
18. Gesing A., Wiesenborn D., Do A., Menon V., Schneider A., Victoria B. et al. A long-lived mouse lacking both growth hormone and growth hormone receptor: a new animal model for aging studies. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2017; 72(8): 1054-61.
19. Corpas E., Harman S.M., Blackman M.R. Human growth hormone and human aging. *Endocrine Reviews.* 1993; 14: 20-39.
20. Fabris N., Pierpaoli W., Sorkin E. Lymphocytes, hormones and ageing. *Nature.* 1972; 240(5383): 557-9.
21. Shire J.G. Growth hormone and premature ageing. *Nature.* 1973; 245(5422): 215-6.
22. Silberberg R. Vertebral aging in hypopituitary dwarf mice. *Gerontologia.* 1973; 19(5): 281-94.
23. Darcy J., Bartke A. Functionally enhanced brown adipose tissue in Ames dwarf mice. *Adipocyte.* 2017; 6(1): 62-7.
24. Duran-Ortiz S., Noboa V., Kopchick J.J. Disruption of the GH receptor gene in adult mice and in insulin sensitive tissues. *Growth Horm. IGF Res.* 2018;38: 3-7.
25. Basu R., Qian Y., Kopchick J.J. Mechanisms in endocrinology: Lessons from growth hormone receptor gene-disrupted mice: are there benefits of endocrine defects? *Eur. J. Endocrinol.* 2018;178(5): R155-81.
26. Laron Z., Kauli R., Lapkina L., Werner H. IGF -1 deficiency, longevity and cancer protection of patients with Laron syndrome. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2017; 772: 123-33.
27. Jung S., Boie G., Doerr H.G., Trollmann R. Oxygen-sensitive regulation and neuroprotective effects of growth hormone-dependent growth factors during early postnatal development. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2017; 312(4): R539-48.
28. Aguiar-Oliveira M.H., Bartke A. Growth hormone deficiency: health and longevity. *Endocr. Rev.* 2018; 12: 326-33.
29. Reddy S.S.K., Chaiban J.T. The endocrinology of aging: a key to longevity "great expectations". *Endocr.Pract.* 2017; 23(9): 1107-16.
30. Bartke A., Quainoo N. Impact of growth hormone-related mutations on mammalian aging. *Front Genet.* 2018; 9: 586.
31. Brown-Borg H.M., Rakoczy S.G. Catalase expression in delayed and premature aging mouse models. *Exp. Gerontol.* 2000; 35(2): 199-212.
32. Hauck S.J., Bartke A. Effects of growth hormone on hypothalamic catalase and Cu/Zn superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28(6): 970-8.
33. Brown-Borg H.M., Johnson W.T., Rakoczy S.G. Expression of oxidative phosphorylation components in mitochondria of long-living Ames dwarf mice. *Age (Dordr.).* 2012; 34(1): 43-57.
34. Salmon A.B. Fibroblast cell lines from young adult mice of long-lived mutant strains are resistant to multiple forms of stress. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005; 289(1): E23-9.
35. Tang Y., Purkayastha S., Cai D. Hypothalamic microinflammation: a common basis of metabolic syndrome and aging. *Trends Neurosci.* 2015; 38(1): 36-44.
36. Selman C. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science.* 2009; 326(5949): 140-4.
37. Wijsman C.A. Familial longevity is marked by enhanced insulin sensitivity. *Aging Cell.* 2011; 10(1): 114-21.
38. Johnson S.C., Rabinovitch P.S., Kaeblerlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature.* 2013; 493(7432): 338-45.
39. Neff F. Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging. *J. Clin. Invest.* 2013; 123(8): 3272-91.
40. Vitale G., Barbieri M., Kamenetskaya M., Paolisso G. GH/ IGF -1/ insulin system in centenarians. *Mech. Ageing Dev.* 2017; 165: 107-14.
41. Sadagurski M., Cady G., Miller R.A. Anti-aging drugs reduce hypothalamic inflammation in a sex-specific manner. *Aging Cell.* 2017; 16(4): 652-60.
42. Greer K.A., Hughes L.M., Masternak M.M. Connecting serum IGF-1, body size, and age in the domestic dog. *Age (Dordr.).* 2011; 33(3): 475-83.
43. Kienzle E., Moik K. A pilot study of the body weight of pure-bred client-owned adult cats. *Br. J. Nutr.* 2011; 106(Suppl 1): S113-5.
44. Brosnahan M.M., Paradis M.R.. Demographic and clinical characteristics of geriatric horses: 467 cases (1989-1999). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003; 223(1): 93-8.
45. Holzenberger M. IGF-1 signaling and effects on longevity. *Nestle Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program.* 2011; 68: 237-49.
46. Taguchi A, Wartschow LM, White MF. Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science.* 2007; 317(5836): 369-72.

Поступила 24.10.19
Принята к печати 29.10.19

© КОЛОТЬЕВА Н.А., ГИЛЬМИЯРОВА Ф.Н., 2019

Колотьева Н.А., Гильмиярова Ф.Н.

РОЛЬ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ В РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

Статья посвящена межмолекулярным взаимодействиям, в частности взаимодействиям белков и естественных интермедиатов (малых молекул). Молекулы с молекулярной массой от 40 до 1000 Да находятся в свободном состоянии в цитоплазматическом растворе и образуют пул промежуточных продуктов. Представлены методы компьютерного моделирования для предсказания белок – белковых, белок – лигандных, белок – малая молекула взаимодействий. Программой для моделирования прогнозируемой биологической активности in silico является Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). В системе Search Tool for Interacting Chemicals (STITCH) возможно определение потенциальных белковых партнеров взаимодействия для малых молекул. В обзоре литературы представлены современные данные о малых молекулах – переключателях обменов веществ, таких как α -глицерофосфат – дигидроксиацетонфосфат, пируват – лактат, оксалоацетат – малат. Изучаемые нами молекулы оказывают разнонаправленные и множественные влияния на метаболизм и на системы межклеточного взаимодействия. Естественные интермедиаты находятся на точке пересечения метаболических путей обмена белков, углеводов, липидов, являются сигнальными молекулами, участвуют в регуляции функции белка, экспрессии генов, активности ферментов. Увеличивающийся интерес по расшифровке взаимодействий белок – малая молекула / метаболит на системном уровне заложит концептуальную основу, которая обеспечивает представление о сложной эпигенетической регуляции при различных воздействиях окружающей среды. Полный интерактом, включая взаимодействие белок-малая молекула, будет иметь решающее значение для того, чтобы в конечном итоге распутать сложные отношения между генотипом и фенотипом и обеспечить более глубокое понимание здоровья и болезней.

Ключевые слова: малые молекулы; пируват; лактат; оксалоацетат; малат; α -глицерофосфат; дигидроксиацетонфосфат; обзор.

Для цитирования: Колотьева Н.А., Гильмиярова Ф.Н. Роль малых молекул в регуляции обмена веществ (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12): 716-722. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-716-722>.

Kolotyeva N.A., Gilmiyarova F.N.

THE ROLE OF SMALL MOLECULES IN METABOLISM REGULATION (REVIEW OF LITERATURE)

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

The paper focuses on intermolecular interactions, particularly interactions between proteins and natural intermediates (small molecules). Molecules with a molecular weight of up to 1000 Da are free in cytoplasmic solution and form a pool of intermediates. Methods of computer modeling for prediction of protein-proteinaceous, protein-ligand, protein – a small molecule of interactions are presented. The program for modeling predicted biological activity in silico is Prediction of Activity Spectrum for Substances (PASS). In the Search Tool for Interacting Chemicals (STITCH) system, it is possible to identify potential protein interaction partners for small molecules.

A review of the literature presents modern data on small molecules – metabolic switches, such as α -glycerophosphate-dihydroxyacetone phosphate, pyruvate-lactate, oxaloacetate-malate. The molecules we study have different and multiple effects on metabolism and on intercellular interaction systems. Natural intermediates are at the intersection of metabolic pathways of metabolism of proteins, carbohydrates, lipids; they are signal molecules, participate in regulation of protein function, gene expression, enzyme activity. An increasing interest in deciphering protein-small molecule/metabolite interactions at the systemic level will lay a conceptual foundation that provides insight into complex epigenetic regulation under various environmental influences. A complete interplay, including a protein-small molecule interaction, will be crucial to eventually unraveling the complex relationships between the genotype and phenotype and to provide a deeper understanding of health and disease.

Key words: small molecules; pyruvate; lactate; oxaloacetate; malate; α -glycerophosphate; dihydroxyacetonephosphate; review.

For citation: Kolotyeva N.A., Gilmiyarova F.N. The role of small molecules in metabolism regulation (review). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostica (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (12): 716-722. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-716-722>

For correspondence: Kolotyeva N.A., PhD, docent of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics, e-mail: bio-sam@yandex.ru

Information about authors:

Kolotyeva N.A., <https://orcid.org/0000-0002-7853-6222>

Gilmiyarova F.N., <http://orcid.org/0000-0001-5992-3609>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 21.10.2019
Accepted 30.10.2019

Под малыми молекулами принято понимать соединения органической природы с молекулярной массой от 40 до 1000 Да, которые находятся в свободном состоянии в цитоплазматическом растворе, образуя пул промежуточных продуктов [1].

В связи с трудоемкостью, сложностью в изучении и дороговизной экспериментальных методов, важнейшая роль отводится методам *in silico* предсказания белок – белковых, белок – лигандных, белок – малая молекула взаимодействий. Компьютерное моделирование становится важным инструментом, использующимся для интегрированного подхода к пониманию сложных внутри- и межклеточных процессов. Сведения о белках, малых молекулах, структуре генов, а также возможные функциональные взаимосвязи между ними собраны в библиотеки и базы данных: Drug Bank, GPCRligand (GLIDA), Matador, Киотская энциклопедия генов и геномов (KEGG), сравнительной токсикогеномики (CTD), биоактивных молекул ChEMBL, Protein Data Bank, MEDLINE, PubMed Central, NIH RePORTER и другие. Последние современные технологические достижения позволили объединить и изучить большой массив данных, в результате чего были найдены некоторые «неожиданные» взаимодействия белков с малыми молекулами, которые могут оказать глубокое влияние на наше понимание передачи сигналов клетками. Одной из программ моделирования прогнозируемой биологической активности *in silico* является Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) [2]. В основе лежит описание структурной формулы с использованием единого описания химической структуры и универсального математического алгоритма установления зависимостей «структура-активность». В системе Search Tool for Interacting Chemicals (STITCH) версии 5.0. (Инструмент поиска взаимодействующих химических веществ) возможно определение потенциальных белковых партнеров взаимодействия для малых молекул. Доступен полнотекстовый поиск по идентификаторам и общим названиям химических веществ и белков, сведения о малой молекуле вводятся с применением стандартной записи SMILES для поиска аналогичных химических веществ. Сеть взаимодействия может быть отображена и настроена по степени доказательности (evidence), уверенности (confidence), молекулярному действию (molecular action) или аффинитету связи (binding affinity) [3].

Группой ученых во главе с X. Li [4] было проведено систематическое изучение литературы, опубликованной с 2002 по 2011 г., посвященной межмолекулярным взаимодействиям, в частности изучению белков и малых молекул. У дрожжей, например, было выявлено до 43,7 миллионов белок – белковых, белок – ДНК, белок – РНК, белок – метаболит (малая молекула) взаимодействий. Лишь в 2009 г. появились первые данные об изучении белков и малых молекул, что отстает от исследования других типов отношений [4]. По данным этого исследования многие естественные метаболиты обладают структурным сходством с известными искусственными малыми молекулами из базы данных белков (PDB), и характеризуются по сходству размера (от 40 до 1000 Да) и химическим

свойствам (гидрофобность легкой и средней степени). С другой стороны, малые молекулы, рассеянные вокруг белка, могут связывать и изменять его биологические функции, такие как активность ферментов и интерактивность белков. Эти взаимодействия являются важным средством аллостерической регуляции ферментов и рецепторов [4].

Существование посттрансляционной модификации расширяет возможности клеток в регуляции метаболизма. Обратимые посттрансляционные модификации более склонны предлагать динамическую модуляцию активности белка в ответ на внешние и внутренние сигналы, в то время как необратимые в основном, но не исключительно, связаны с синтезом и деградацией белка, мембранным нацеливанием и межбелковым взаимодействием. Большинство посттрансляционных модификаций зависят от уровня метаболита и, в свою очередь, регулируют активность или количество ферментов. Центральный углеродный обмен обеспечивает предшественники, необходимые для добавления к белкам и для модификации ДНК. Модификации гистонов и ДНК (главным образом, метилирование) приводят к серьезным эпигенетическим изменениям. Тем не менее, ферменты сами являются мишенями для посттрансляционных изменений, что приводит к обратной регуляции метаболизма. Таким образом, почти любой фермент в центральном метаболизме подвергается посттрансляционным модификациям, и если рассматривать только современные идентифицированные варианты с функциональной релевантностью, то значительное количество ферментов подвержено множественным изменениям [5]. Например, 30% сайтов ацетилирования в клетках человека также являются сайтами убиквитинирования, что приводит к конкуренции между ацетилированием и убиквитинированием для регуляции стабильности белка [6].

Целесообразным, на наш взгляд, является изучение роли естественных интермедиатов – переключателей обменов веществ. Метаболиты взаимодействуют с различными белками ферментативно в качестве субстратов и продуктов или аллостерически в качестве кофакторов или лигандов. Изучение малых молекул представляется актуальной задачей, поскольку остается достаточное количество вопросов о функционировании, транспорте и межмолекулярном взаимодействии метаболитов с окружающими белками. Ожидается, что документирование и интерпретация взаимодействий между метаболитами и белками в биологическом контексте будут важны для определения качества здоровья человека и медицины в целом, помогая исследователям понять молекулярную основу здоровых и больных состояний. Мы считаем необходимым подробнее изучить такие пары метаболитов как α -глицерофосфат – дигидроксиацетонфосфат, пируват – лактат, оксалоацетат – малат.

Образующийся во время гликолиза α -глицерофосфат, является исходным субстратом для цикла глицеролипид / свободная жирная кислота и находится на перекрестке метаболизма глюкозы и липидов. Участие α -глицерофосфата во многих биологических процессах и его доступность для клеточных структур

регулирует многие клеточные функции, такие как секреция инсулина, глюконеогенез, чувствительность к инсулину, синтез и накопление жира, а также выживание и пролиферация клеток, включая раковые клетки [7].

До недавнего времени считалось, что в клетках животных у α -глицерофосфата по существу две судьбы: одна – это превращение в дигидроксиацетон-3-фосфат, а другая – проникновение в липогенный путь через образование лизофосфатидной кислоты под действием глицерол-3-фосфат-ацилтрансферазы. α -глицерофосфат также может быть синтезирован путем прямого фосфорилирования глицерина глицерокиназой, однако она ограничена в своей активности и присутствует в основном в печени и почках и слабо экспрессируется в островках поджелудочной железы, мозге и других тканях. В печени, почках и жировых тканях, которые вырабатывают цитозольную фосфоенолпируваткарбоксикиназу, образование α -глицерофосфата также может осуществляться посредством глицеронеогенеза, начиная с лактата, пирувата, аланина или глутамина [8].

Недавние исследования показывают, что канцерогенез зависит не только от гликолиза, но и от липидного обмена, что открыло новое терапевтическое окно для лечения рака [9]. Таким образом, контроль уровня α -глицерофосфата в клетке может предложить механизм, с помощью которого многие патогенные пути, вовлеченные в ожирение, сахарный диабет 2 типа, а также в пролиферацию раковых клеток, могут быть замедлены.

В ходе эволюции предполагается, что клетки млекопитающих утратили способность непосредственно гидролизовать α -глицерофосфат до глицерина, пока недавнее открытие не показало, что ранее известный фермент млекопитающих, фосфогликолатфосфатаза, может функционировать как фосфатаза глицерол-3-фосфата и регулировать уровень α -глицерофосфата. Появляющиеся в литературе данные указывают на то, что фосфогликолатфосфатаза является эволюционно консервативным «многозадачным» ферментом, который принадлежит к суперсемейству ферментов, подобных галогенкислотной дегалогеназоподобной фосфатазе, и способен гидролизовать α -глицерофосфат, богатый физиологически значимый субстрат, а также другие метаболиты, включая 2-фосфогликолат, 4-фосфоэритронат и 2-фосфолактат, которые присутствуют в гораздо меньших количествах в клетках при нормальных условиях. Глицерол-3-фосфатфосфатаза, регулируя уровни α -глицерофосфата, играет критическую роль в промежуточном метаболизме, включая гликолиз, окисление глюкозы, клеточный окислительно-восстановительный потенциал и выработку АТФ, глюконеогенез, этерификацию жирных кислот в направлении синтеза глицеролипидов и окисления жирных кислот [10].

Дигидроксиацетонфосфат – окислительно-восстановительный партнер α -глицерофосфата. Равновесие реакции смещено в сторону образования дигидроксиацетонфосфата, и это имеет высокий биологический смысл: при недостатке энергии эта молекула изомеризуется в глицеральдегид-3-фосфат и продолжает свой

путь в гликолитическом процессе, при достаточном количестве энергии дигидроксиацетонфосфат может вступать на путь биосинтеза липидов, превращаясь в α -глицерофосфат. Также этот интермедиат является субстратом для глюконеогенеза. Кроме этого, дигидроксиацетонфосфат косвенно участвует в метаболизме этанола. Накопление дигидроксиацетонфосфата, без использования его в других метаболических путях, может приводить к повреждению клеточных структур, так как данный метаболит ферментативно и неферментативно может превращаться в токсичное вещество – метилглиоксаль, которое специфически взаимодействует с белками [11].

Глицерофосфатный челночный механизм – вторая важнейшая, наравне с малат-аспартатной, редокс-система – был впервые описан в работе Green D.E., который отметил присутствие данного фермента во многих тканях млекопитающих. Данная система является тонким регулятором синтеза триглицеридов и фосфолипидов, поскольку митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа и глицерол-3-фосфат ацилтрансфераза конкурируют за единый субстрат, определяя приоритетное для клетки в данный момент времени направление метаболизма [12, 13]. Согласно современным представлениям, митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа расположена не только в бурой жировой ткани: высокое содержание зафиксировано также в мышцах, головном мозге, поджелудочной железе, яичках, плаценте и фибробластах, а низкое – в печени и сердце [13]. Роль данной системы велика в успешном протекании акросомальной реакции, при которой происходит разрушение желточной оболочки яйцеклетки, поскольку в акросоме сперматозоидов содержится большое количество митохондриальной изоформы глицерофосфатдегидрогеназы [14]. Кроме этого, митохондриальная глицерофосфатдегидрогеназа участвует в продукции свободных кислородных радикалов в плаценте во время первого триместра беременности, активируя работу антиоксидантных систем матери и плода [15]. Отмечено значение данной системы в патогенезе сахарного диабета. Синтез глюкозы сопровождается подъемом содержания кальция, который также является активатором митохондриальной глицерофосфатдегидрогеназы [16].

Одним из важнейших промежуточных компонентов метаболизма и источником энергии для митохондрий является пируват. Он участвует в окислительном фосфорилировании, глюконеогенезе, липогенезе *de novo*, синтезе холестерина, а также поддержании функционирования цикла трикарбоновых кислот. Эта малая молекула синтезируется в результате реакций анаэробного гликолиза под действием фермента пируваткиназы, а также образуется из различных прекурсоров: лактата под действием лактатдегидрогеназы, малата под действием цитозольной малатдегидрогеназы, возможен синтез пирувата из аланина в митохондриях. Также в пируват могут быть превращены серин, треонин, глицин, цистеин и триптофан [17]. Пируват, наряду с субстратами цитратного цикла (цитратом, сукцинатом, малатом и др.), лактатом, глицерином, аминокислотами (аланин, глутамин, серин

и др.) участвует в регуляции метаболизма глюкозы с помощью метаболического шунтирования.

Пируват имеет две судьбы. Во-первых, в митохондриях пируват катаболизируется, для синтеза ацетил-КоА митохондриальным комплексом пируватдегидрогеназой, и ацетил-КоА тогда полностью окисляется через цикл трикарбоновых кислот с образованием цитрата, оксалоацетата, малата и других метаболитов. Во-вторых, пируват превращается в лактат, который выделяется в кровообращение и используется гепатоцитами для производства глюкозы посредством глюконеогенеза. Гликолитические продукты используются для синтеза жирных кислот посредством липогенеза *de novo*. Инсулин активирует превращения пирувата в ацетил-КоА, который в дальнейшем может быть использован не только для выработки метаболической энергии, но и для биосинтеза липидов, кетонных тел, биогенных аминов и ацетилхолина. С другой стороны, жирные кислоты, высвобождаемые при липолизе, доставляются в печень и метаболизируются до ацетил-КоА, который усиливает активность пируваткарбоксилазы, направляя пируват в глюконеогенный путь. Таким образом, пируват, основной гликолитический продукт, обеспечивает источник углерода для липогенеза и связывает гликолиз с липогенезом [18].

В 2012 г. двумя независимыми исследовательскими группами с помощью применения биоинформационных и генетических методов был открыт комплекс белков, отвечающий за транспорт пирувата через митохондриальную мембрану, который получил название митохондриальный переносчик пирувата (МРС) [19]. Данный комплекс состоит из трех типов белков, два из которых, МРС-1 и МРС-2, весом 12 и 15 кДа соответственно, встречаются почти во всех живых организмах и формируют олигомерный комплекс на внутренней мембране митохондрий весом порядка 150 кДа. Было отмечено, что ткани организма не однородны по экспрессии белков семейства МРС. Пируват, в особенности его митохондриальная фракция, имеет большое значение для обменных процессов поджелудочной железы, в частности, секреции инсулина. Известно, что β -клетки поджелудочной железы имеют рецепторы к белкам и МРС-1, и МРС-2. Блокирование данных рецепторов специфическим ингибитором пирувата α -циано-4-гидроксициннаматом приводит к уменьшению потребления кислорода, а также уменьшению соотношения АТФ/АДФ и НАДФН/НАДФ, что приводит к нарушению выделения инсулина, а также вызывает сбой в работе потенциал-зависимых калиевых ионных каналов [20].

Окисление пирувата составляет от 10 до 30% метаболизма миокарда. В связи с этим, снижение уровня митохондриального метаболизма пирувата за счет увеличения экспрессии киназы пируватдегидрогеназы служит одним из звеньев патогенеза развития ишемии сердечной мышцы [21].

В то же время, являясь α -кетокислотой, пируват способен проявлять цитопротективные свойства, сходные по эффективности воздействия с глутатионом, элиминируя молекулы пероксида водорода посредством деркабоксилирования и образования воды

и углекислого газа. Показаны противовоспалительные эффекты пирувата в патогенезе модели сепсис-индуцированной острой почечной недостаточности, инфаркта миокарда, ишемического инсульта, однако молекулярные основы такого эффекта требуют дальнейшего изучения. Установлено, что пируват является критическим метаболитом в развитии острой почечной недостаточности любого генеза – данное патологическое состояние сопровождается падением уровня пирувата. Обсуждаются возможности терапии данного состояния внутривенным введением этого метаболита [22].

Аберрантный метаболизм пирувата был отмечен в клетках опухолей и назван эффектом Варбурга. Однако метаболический субстрат данного биохимического феномена долгое время оставался неустановленным. Проведенные исследования показали, что именно изоформа пируваткиназы РКМ-2 (изоформа, ассоциированная с клеточной пролиферацией) является маркером незрелости клеток и отвечает за развитие эффекта Варбурга [23].

Лактоацидоз типа А, вызванный гипоксической митохондриальной дисфункцией, является независимым предиктором смертности для критически больных пациентов. Во время гипоксии активность пируватдегидрогеназы значительно ингибируется. Пируват, является активатором и субстратом пируватдегидрогеназы, и способен модулировать кислотный рН крови путем улучшения метаболических путей в условиях гипоксии и, таким образом, может быть оптимальным средством для коррекции лактатацидоза. Пируват имеет низкую константу диссоциации ($pK_a = 2,49$), что свидетельствует о его более слабой буферной способности по сравнению с лактатом ($pK_a = 3,9$). Следовательно, пируват может устранять лактатацидоз в основном благодаря своим биохимическим характеристикам в стимулировании энергетического обмена и улучшении митохондриальной энергетике для окисления накопленного лактата и потребления избыточных протонов. Экзогенный пируват защищает функции многих органов при гипоксии, включая функции печени и почек, главных органов метаболизма глюконеогенеза, что способствует оксигенации тканей и клиренсу лактата [24]. Пируват является ключевым энергетическим метаболическим субстратом и активатором пируватдегидрогеназы с несколькими уникальными полезными биологическими свойствами, включая антиоксидантное и противовоспалительное действие и способность активировать сигнальный путь HIF-1 α – эритропоэтин. Экзогенный пируват в натриевой соли сохраняет метаболизм глюкозы и клеточную энергетiku, превосходя эффекты анионов бикарбоната, лактата, ацетата и малата в жидкостях внутривенного введения при эффективной коррекции гипоксического лактатацидоза [25].

Лактат долгое время находился в центре противоречий. С момента своего открытия в 1780 г. немецкоязычным шведским аптекарем и химиком Карлом Вильгельмом Шееле молочной кислоты в кислом молоке, лактат часто ошибочно рассматривали как гипоксический тупиковый метаболит с множественными вредными эффектами. Только в 1980-х годах,

с введением клеточного лактатного челнока, произошел сдвиг парадигмы понимания роли лактата в метаболизме. Доказательства того, что лактат в качестве основного игрока в координации метаболизма всего тела с тех пор быстро растет. Современное понимание состоит в том, что лактат – это повсеместный метаболический промежуточный продукт, действующий одновременно как конечный продукт гликолитического метаболизма и промежуточный продукт для полного окисления углеводов путем окислительного фосфорилирования. Лактат является энергетическим промежуточным продуктом, который может образовываться в тканях, подвергающихся ускоренному гликолизу, и впоследствии распространяться по всему телу для поглощения в качестве топлива для окисления или в качестве предшественника для глюконеогенеза или гликогенеза. У людей основными источниками внутриклеточного L-лактата являются глюкоза и аланин благодаря их превращению в пируват. Было установлено, что в состоянии после абсорбции примерно 65% L-лактата в плазме происходит из глюкозы, в то время как 16-20% L-лактата в плазме происходит из аланина [26].

V.F.Miller и M.J.Roef и соавт. [27,28] с, продемонстрировали, что лактат является важным глюконеогенным предшественником как при низкой, так и при средней интенсивности упражнений. Эти исследования подчеркивают роль лактата как, возможно, самого важного субстрата для глюконеогенеза, и, конечно, ключевую роль в этом печени как важного участника в синтезе клеточного лактата.

Большое количество исследований в настоящее время показало, что трансмембранное движение лактата в целом осуществляется белками Solute Carrier Family 16 (SLC16), одним из 52 семейств SLC с более чем 300 участниками. В частности, монокарбоксилатные транспортеры (MCT) представляют собой семейство транспортеров, включающее 14 родственных белков, только первые четыре из которых особенно важны для транспорта лактата, пирувата и кетонных тел. Скорость обмена лактата резко повышается благодаря активности монокарбоксилатных транспортеров. Монокарбоксилатные транспортеры 1–4 не зависят от энергии (то есть пассивны) и способствуют снижению градиентов концентрации метаболита в сочетании с ионами водорода. Одновременный прогресс в изучении семейства монокарбоксилатных транспортеров позволил концептуальным изменениям роли лактата как промежуточного звена в метаболизме [29].

Цитозоль-митохондриальный лактатный челнок описывает непрерывное гликолитическое продуцирование и митохондриальное окисление лактата в клетке своего происхождения [26]. Соотношение лактат / пируват является преобладающей цитозольной окислительно-восстановительной парой для НАД⁺/НАДН. Повышения концентрации аниона лактата во время клеточного стресса представляют собой сигнальную молекулу – «лактормон». Помимо того, что лактат сам служит в качестве окисляемого топлива, он также ингибирует липолиз и пропорционально снижает окисление и утилизацию глюкозы. Счита-

ется, что лактат достигает этой лактормоноподобной регуляции метаболизма, взаимодействуя с рецептором GPR81, связанным с G-белком на жировых клетках, чтобы ингибировать липолиз. Уровень экспрессии GPR81 намного выше в жировой ткани, чем в мозге, скелетных мышцах, сердце и других тканях [30].

Поскольку лактат является конечным продуктом, монокарбоксилатные транспортеры MCT1 и MCT4 часто сверхэкспрессируются при многих видах рака, что коррелирует с плохим прогнозом и высокой смертностью [31].

Оксалоацетат является переключателем обменов белков, углеводов, участвует в метаболических путях, включая глюконеогенез, цикл лимонной кислоты, цикл глиоксилата, цикл мочевины и метаболизм аминокислот. Оксалоацетату свойственно явление таутомерии, представляет собой ценную и достаточно редкую молекулу, ее концентрация в митохондриях не превышает 10^{-6} М [32]. Оксалоацетат оказывает ингибирующее воздействие на сукцинатдегидрогеназу, которая является не только участником цикла Кребса, но и важным элементом в цепи переноса электронов. Установлено, что нарушение функции сукцинатдегидрогеназы сопровождается рядом патологических состояний, таких как синдром Ли, синдром семейной параганглиомы, нейроэндокринные опухоли [33].

Помимо прочего, оксалоацетат является участником глиоксилатного цикла – анаболического пути, сходного с циклом трикарбоновых кислот, присущего растениям, протеем и дрожжам. В ходе данного цикла происходит превращение уксусной кислоты в ди- и трикарбоновые кислоты, а промежуточным продуктом является глиоксиловая кислота. Имеются данные о функционировании данного пути и в клетках печени человека [34].

Продолжая перечислять внутриклеточные функции оксалоацетата, важно отразить участие данного интермедиата в процессах глюконеогенеза и глицерогенеза, более того, под действием фермента фосфоенолпируваткарбоксикиназы оксалоацетат способен увеличивать объем митохондрий в поперечно-полосатой мускулатуре, что положительно сказывается на выносливости и уменьшает мышечное утомление [35].

Малат – окислительно-восстановительный партнер оксалоацетата – универсальная молекула, общая для абсолютного большинства организмов от бактерий архейской эпохи до млекопитающих. Малат принимает участие в гликолизе, β -окислении высших жирных кислот, синтезе аминокислот, играет важную роль в транспортном сообщении между митохондриями и цитозолем [36].

Исследование миокардиоцитов в период ишемии и в момент постишемической реперфузии показало колоссальную важность малат-аспартатной системы в адекватном обеспечении клеток энергией. В момент восстановления кровотока по коронарным артериям наблюдается диссоциация метаболитов челнока в митохондриях и цитозоле, что делает гликолиз единственным возможным путем получения энергии и сопровождается накоплением лактата [37].

Малат-аспартатный механизм является звеном антиоксидантной защиты: наличие этой системы было необ-

ходимо для поддержания жизнедеятельности клеточной линии PC 12, а при уменьшении содержания малат-аспартатного челнока наблюдалось снижение концентрации глутатиона [38]. Синтез инсулина бета-клетками поджелудочной железы, нейротрансмиттеров также затруднен без участия малат-аспартатной системы [39].

Известно, что оксалоацетат способен препятствовать нейровоспалению, нероидегенерации и уменьшать содержание глутамата в головном мозге, что обусловило проведение доклинических испытаний препаратов оксалоацетата против болезни Альцгеймера и как первой линии терапии при ишемическом инсульте головного мозга и был назван биоэнергетическим лекарственным препаратом, специально разработанным для повышения уровня энергии клеток. Нейропротекторное действие оксалоацетата основано на его способности вызывать снижение уровня глутамата в крови в результате активации резидентного в крови фермента глутамат-оксалоацетаттрансаминазы, который катализирует обратимое превращение оксалоацетата и глутамата в аспартат и α -кетоглутарат [33]. Благодаря центральной роли в энергетическом обмене, способен изменять биоэнергетическую инфраструктуру мозга, увеличивая уровень митохондриального белка и митохондриальную массу, активировать путь передачи сигналов инсулина и образование новых нейронов в гиппокампе, уменьшать воспаление [40].

Таким образом, изучаемые нами молекулы оказывают разнонаправленные и множественные влияния на метаболизм и на системы межклеточного взаимодействия. Естественные интермедианты пируват, лактат, α -глицерофосфат, дигидроксиацетонфосфат, оксалоацетат и малат находятся на точке пересечения метаболических путей обмена белков, углеводов, липидов, являются сигнальными молекулами, участвуют в регуляции функции белка, экспрессии генов, активности ферментов. Актуальным является дальнейшее изучение особенностей влияния естественных метаболитов на белок-белковые, фермент-субстратные взаимодействия, что позволит найти новые роли интермедиатов и пути к выяснению механизмов различных превращений, в основе которых лежат процессы межмолекулярного узнавания.

Увеличивающийся интерес по расшифровке взаимодействий белок – малая молекула / метаболит на системном уровне заложат концептуальную основу, которая обеспечивает представление о сложной эпигенетической регуляции при различных воздействиях окружающей среды. Полный интерактом, включая взаимодействие белок-малая молекула, будет иметь решающее значение для того, чтобы в конечном итоге распутать сложные отношения между генотипом и фенотипом и обеспечить более глубокое понимание здоровья и болезней.

Большой массив данных, возникающих из областей геномики, транскриптомики, протеомики и метаболомики, в настоящее время интегрируется в понятие паномики с целью улучшения нашего понимания патофизиологии, диагностики и лечения. Будущее медицины – это то, где данные паномики используются для создания диагностических инструментов, обладающих большей мощностью и лечением, которые все

больше учитывают генетическую и метаболическую изменчивость каждого человека. Конечной целью будет быстрая диагностика заболевания с использованием индивидуального подхода, то есть точной прецизионной медицины.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Fechner P., Bleher O., Ewald M., Freudenberger K., Furin D., Hilbig U. et al. Size does matter! Label-free detection of small molecule-protein interaction. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014; 406: 4033–51.
2. Poroikov V. V., Filimonov D. A., Ihlenfeldt W.D. et al. PASS biological activity spectrum predictions in the enhanced open NCI database browser. *J Chem Inform Comput Sci.* 2003; 4(1): 228–36.
3. Kuhn M., Szklarczyk D., Franceschini A., Campillos M., von Mering C., Jensen L. J. et al. STITCH 2: an interaction network database for small molecules and proteins. *Nucleic acids research.* 2010; 38(Database issue): D552–6.
4. Li X., Wang X., Snyder M. Systematic investigation of protein-small molecule interactions. *IUBMB Life.* 2013; 65(1): 2–8.
5. Lorendeau D., Christen S., Rinaldi G., Fendt S.M. Metabolic control of signaling pathways and metabolic auto-regulation. *Biol. Cell.* 2015; 107(8): 251–72.
6. Wagner S.A., Beli P., Weinert B.T., Nielsen M.L., Cox J., Mann M. et al. A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol. Cell. Proteomics.* 2011; 10(10): M111.013284.
7. Prentki M., Madiraju S.R. Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet beta-cell function in health, obesity and diabetes. *Mol. Cell Endocrinol.* 2012; 28;353(1-2): 88–100.
8. Brito S.C., Festuccia W.L., Kawashita N.H., Moura M.F., Xavier A.R., Garofalo M.A. et al. Increased glyceroneogenesis in adipose tissue from rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet: role of dietary fatty acids. *Metabolism.* 2006; 55(1): 84–9.
9. Vander Heiden M.G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011; 31;10(9): 671–84.
10. Possik E., Madiraju S.R.M., Prentki M. Glycerol-3-phosphate phosphatase/PGP: Role in intermediary metabolism and target for cardiometabolic diseases. *Biochimie.* 2017; 43:18–28.
11. Compagno C., Brambilla L., Capitanio D., Boschi F., Ranzi B.M., Porro D. Alterations of the glucose metabolism in a triose phosphate isomerase-negative *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Yeast.* 2001; 18(7): 663–70.
12. Green D.E. Alpha-Glycerophosphate dehydrogenase. *Biochem. J.* 1936; 30(4): 629–44.
13. Mracek T., Drahota Z., Houštek J. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013; 1827(3): 401–10.
14. Kota V., Rai P., Weitzel J.M., Middendorff R., Bhande S.S., Shivaji S. Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mouse sperm capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 2010; 77(9): 773–83.
15. Myatt L., Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell Biol.* 2004; 122(4): 369–82.
16. Schuit F., De Vos, A., Farfari S., Moens K., Pipeleers D., Brun T. et al. Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 25;272(30): 18572–9.
17. McCommis K.S., Finck B.N. Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. *Biochem. J.* 2015; 15;466(3): 443–54.
18. Rui L. Energy Metabolism in the Liver. *Compr Physiol.* 2014; 4(1): 177–97.
19. Herzig S., Raemy E., Montessui S., Veuthey J.L., Zamboni N., Westermann B. et al. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science.* 2012; 6;337(6090): 93–6.
20. Patterson J.N., Cousteils K., Lou J.W., Manning Fox J.E., Macdonald P.E., Joseph J.W. Mitochondrial metabolism of pyruvate is es-

- sential for regulating glucose-stimulated insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 2014; 9;289(19): 13335-46.
21. Schroeder M.A., Lau A.Z., Chen A.P., Gu Y., Nagendran J., Barry J. et al. Hyperpolarized (13)C magnetic resonance reveals early- and late-onset changes to in vivo pyruvate metabolism in the failing heart. *Eur. J. Heart Fail.* 2013; 15(2): 130-40.
 22. Johnson A.C.M., Zager R.A. Pyruvate Acute kidney injury. Injury-induced depletion. *Nephron Clin. Pract.* 2014; 127: 129-32.
 23. Upadhyay M., Samal J., Kandpal M., Singh O.V., Vivekanandan P. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther.* 2013; 137(3): 318-30.
 24. Liu R., Hu X.H., Wang S.M., Guo S.J., Li Z.Y., Bai X.D. et al. Pyruvate in oral rehydration salt improves hemodynamics, vasopermeability and survival after burns in dogs. *Burns.* 2016; 42(4): 797-806.
 25. Hu S., Lin Z.L., Zhao Z.K., Liu R., Ma L., Luo H.M. et al. Pyruvate is superior to citrate in oral rehydration solution in the protection of intestine via hypoxia-inducible factor-1 activation in rats with burn injury. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 2016; 40(7): 924-33.
 26. Rogatzki M.J., Ferguson B.S., Goodwin M.L., Gladden L.B. Lactate is always the end product of glycolysis. *Front Neurosci.* 2015; 27(9): 22.
 27. Miller B.F., Fattor J. J., Ka H., Ma Navazio F., Lindinger M.I., Brooks G.A. Lactate and glucose interactions during rest and exercise in men: effect of exogenous lactate infusion. *J. Physiol.* 2002; 1;544(3): 963-75.
 28. Roef M.J., De Meer K., Kalhan S.C., Straver H., Berger R., Reijngoud D.J. Gluconeogenesis in humans with induced hyperlactatemia during low-intensity exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003; 284(6): E1162-71.
 29. Halestrap A.P. Monocarboxylic acid transport. *Compr. Physiol.* 2013; 3(4): 1611-43.
 30. Brooks G.A. Energy flux, lactate shuttling, mitochondrial dynamics, and hypoxia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 903: 439-55.
 31. San-Millon I., Brooks G.A. Reexamining cancer metabolism: Lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis.* 2017; 1;38(2): 119-33.
 32. Nelson D.L., Cox M.M., Lehninger A.L. Lehninger principles of biochemistry. New York: W.H. Freeman; 2013.
 33. Campos F., Sobrino T., Ramos-Cabrera P., Castillo J. Oxaloacetate: a novel neuroprotective for acute ischemic stroke. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 2012; 44(2): 262-5.
 34. Springsteen G., Yerabolu J.R., Nelson J., Rhea C.J., Krishnamurthy R. Linked cycles of oxidative decarboxylation of glyoxylate as protometabolic analogs of the citric acid cycle. *Nat. Commun.* 2018; 8;9(1): 91.
 35. Hakimi P., Yang J., Casadesus G., Massillon D., Tolentino-Silva F., Nye C.K. et al. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse. *J. Biol. Chem.* 2007; 9;282(45): 32844-55.
 36. Minarik P.N., Tomakova M., Kollarova M., Antalík M. Malate Dehydrogenases – Structure and Function. *Gen. Physiol. Biophys.* 2002; 21(3): 257-65.
 37. Lu, M., Zhou L., Stanley W.C., Cabrera M.E., Saidel G.M., Yu X. Role of the Malate-Aspartate Shuttle on the Metabolic Response to Myocardial Ischemia. *Journal of Theoretical Biology.* 2008; 21;254(2): 466-75.
 38. Wang C., Chen H., Zhang J., Hong Y., Ding X., Ying W. Malate-aspartate shuttle mediates the intracellular ATP levels, antioxidant capacity and survival of differentiated PC12 cells. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2014; 12;6(2): 109-14.
 39. Pardo B., Contreras L., Satrústegui J. De novo Synthesis of Glial Glutamate and Glutamine in Young Mice Requires Aspartate Provided by the Neuronal Mitochondrial Aspartate-Glutamate Carrier Aralar/AGC1. *Front Endocrinol. (Lausanne).* 2013; 15 (4): 149.
 40. Swerdlow R.H., Bothwell R., Hutflers L., Burns J.M., Reed G. Tolerability and pharmacokinetics of oxaloacetate 100 mg capsules in Alzheimer's subjects. *BBA Clinical.* 2016; 10;5: 120-3.

Поступила 21.10.19

Принята к печати 30.10.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Гимадиев Р.Р.^{1,3}, Ниязов А.Р.², Мухин В.Е.¹, Огурцов П.П.¹

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МИКРОРНК ПРИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, Россия;

²ФГБНУ Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ - ИМБП РАН), 123007, Москва, Россия;

³ООО «Евротест», 129110, Москва, Россия

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) рассматривается как одна из ведущих причин развития хронических заболеваний печени во всем мире. Для подтверждения диагноза требуется биопсия печени, однако из-за инвазивности данная процедура не подходит для массового скрининга. Существующие лабораторные критерии первичного обследования пациентов с подозрением на НАЖБП, позволяющие уже на ранней стадии диагностировать развитие патологического процесса, в должной степени не удовлетворяют требованиям клиницистов. В то же время, крайне важно идентифицировать пациентов на начальных стадиях развития НАЖБП. Последние годы внимание исследователей было сосредоточено на расширении знаний о механизме развития НАЖБП и на новых диагностических инструментах. Накапливающиеся результаты исследований показывают, что развитие и прогрессирование НАЖБП регулируется эпигенетическими факторами, в частности семейством микроРНК (микроРНК, miR), которые, в свою очередь, могут иметь высокую диагностическую и прогностическую ценность. В настоящем обзоре баз данных PubMed обсуждается потенциальная роль микроРНК в липидном обмене печени, а также патогенезе жировой болезни печени. Рассмотрены возможности использования микроРНК (микроРНК-16, микроРНК-21, микроРНК-34а, микроРНК-103, микроРНК-122, микроРНК-145, микроРНК-192 и других типов) как перспективных биомаркеров малоинвазивной диагностики НАЖБП, оценки степени активности и стадии стеатоза и фиброза, и в качестве прогностических маркеров течения заболевания. Обсуждаются их аналитические характеристики, преимущества и возможные ограничения их использования в клинической практике. Предварительные результаты исследований позволяют утверждать, что некоторые микроРНК являются крайне перспективным малоинвазивным диагностическим инструментом, что подтверждает необходимость дальнейшего изучения вклада конкретных микроРНК в патогенетические механизмы развития НАЖБП.

Ключевые слова: НАЖБП; микроРНК; биомаркеры; miR-21; miR-34a; miR-103; miR-122; miR-145; miR-192.

Для цитирования: Гимадиев Р.Р., Ниязов А.Р., Мухин В.Е., Огурцов П.П. Диагностическая значимость циркулирующих микроРНК при неалкогольной жировой болезни печени (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12): 723-729. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-723-729>

Gimadiev R.P.^{1,3}, Niazov A.R.², Mukhin V.E.¹, Ogurtsov P.P.¹

THE DIAGNOSTIC IMPORTANCE OF CIRCULATING MICRORNA FOR NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE: LITERATURE REVIEW

¹Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), 117198, Moscow, Russia;

²Institute of Biomedical Problems of Russian Academy of Sciences, 123007, Moscow, Russia;

³LTD «Eurotest», 129110, Moscow, Russia

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the leading causes of chronic liver diseases in the world. The biopsy is required to confirm the diagnosis but due to its invasiveness, this procedure is not suitable for the massive screening. There are laboratory criteria of primary medical examination of the patients who are suspected to have NAFLD that allow diagnosing the pathological process, but these criteria do not comply with clinicians' requirements. At the same time, it is crucial to identify the patients in the initial stages of NAFLD. Recently, the attention of the scientists was concentrated on the research of the mechanism of NAFLD development and new diagnostic approaches. Accumulating results of this research show that NAFLD development is regulated with epigenetic factors, including microRNAs family (microRNA, miR), that may have high diagnostic and prognostic value. In this review, data extracted from PubMed are used to discuss the potential role of microRNA in the liver lipid metabolism and fatty liver disease. The possibilities of micro RNA (miR-16, miR-21, miR-34a, miR-103, miR-122, miR-145, miR-192, and others) use as prospective biomarkers for low-invasive NAFLD diagnostic, evaluation of steatosis activity and fibrosis score and stages, and prognostic markers of the disease are reviewed. This research discusses the analytical characteristics, benefits and possible limitations of their use in the clinical practice. The preliminary data allow claiming that some microRNAs are extremely perspective low-invasive diagnostic instrument and further research is required to investigate the impact of certain microRNAs in the pathogenetic mechanism of NAFLD development.

Key words: NAFLD; microRNA; biomarkers; miR-21; miR-34a; miR-103; miR-122; miR-145; miR-192.

For citation: Gimadiev R.P., Niazov A.R., Mukhin V.E., Ogurtsov P.P. The Diagnostic Importance of Circulating MicroRNA for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (review of literature). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (12): 723-729. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-723-729>

For correspondence: Gimadiev R.R., assistant of the Department of Hospital Therapy with courses of endocrinology, hematology and clinical laboratory diagnostics; e-mail: gimadiev_rr@rudn.university

Information about authors:

Gimadiev R. R., <http://orcid.org/0000-0002-9567-3317>

Mukhin V. E., <http://orcid.org/0000-0001-8973-7890>

Niiazov A. R., <http://orcid.org/0000-0002-1920-7189>

Ogurtsov P. P., <http://orcid.org/0000-0001-7939-891X>

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

Acknowledgment. *The publication has been prepared with the support of the «RUDN University Program 5-100».*

Received 01.09.2019

Accepted 18.10.2019

Введение. Неалкогольная жировая болезнь печени охватывает спектр клинико-морфологических состояний от бессимптомного стеатоза до неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и может прогрессировать до фиброза, цирроза печени и, в ряде случаев, гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [1]. Стеатоз формируется при чрезмерном поглощении гепатоцитами высвобождающихся свободных жирных кислот, например, при метаболическом синдроме и инсулинорезистентности. В дополнение, биохимические нарушения, такие как оксидативный стресс, повышение синтеза провоспалительных медиаторов и апоптоз могут приводить к воспалению и фиброзу печени [2].

В настоящее время «золотым стандартом» для оценки гистологической картины печени у пациентов с НАЖБП остается биопсия печени. Тем не менее, ряд недостатков этой процедуры [3] привели к растущему интересу в поиске альтернативных неинвазивных и малоинвазивных методов оценки НАЖБП [4], основной стратегией повышения эффективности которой является определение тяжести воспаления и степени фиброза печени [5]. Существующие клинико-лабораторные критерии, в должной степени не удовлетворяют требованиям клиницистов, поэтому не прекращается поиск новых перспективных биомаркеров, позволяющих уже на ранней стадии диагностировать развитие патологического процесса. Настоящий обзор посвящен диагностическому потенциалу семейства микроРНК (miR) у пациентов с НАЖБП.

Патофизиологическое значение системы микроРНК. Значительную роль в развитии НАЖБП играют эпигенетические звенья патогенеза – механизмы изменения экспрессии генов, вызванные адаптивным механизмом и не связанным с изменением первичных последовательностей ДНК. Среди эпигенетических модификаций при НАЖБП наиболее изучены микроРНК. Они представляют собой короткие одноцепочечные молекулы РНК (21-25 нуклеотида), регулирующие экспрессию белков генов-мишеней на посттранскрипционной стадии с помощью механизмов, ингибирующих процесс трансляции или деградации матричной РНК (мРНК), или их комбинацией. Действие микроРНК опосредовано их неполной гибридизацией с 3' – нетранслируемой областью целевой мРНК, имеющей комплементарные сайты [6]. МикроРНК проявляют разнообразные биологические функции, связанные с патогенезом НАЖБП, включая регуляцию метаболизма липидов и глюкозы, окисли-

тельного, стресса эндоплазматического ретикулума, клеточной дифференцировки, воспаления, апоптоза и др. [7].

Было выявлено, что избыточная экспрессия miR-34a приводит к увеличению ацетилирования p53 и активации p53-индуцированного апоптоза гепатоцитов за счет регуляции экспрессии сиртуина 1 (SIRT1) в экспериментальных моделях у крыс [8]. Ингибирование miR-34a приводит к активации транскрипционных факторов, участвующих в энергетическом гомеостазе организма: рецептора – α , активируемого пероксисомными пролифераторами (PPAR α) и 5'АМФ-активируемой протеинкиназы, в результате чего наблюдается снижение уровня липидов и степени стеатоза в культуре клеток гепатоцитов мышей с НАЖБП [9]. MiR-7, регулирующая метаболизм жирных кислот посредством PPAR α сигнального пути, обладает липогенным действием [10]. Снижение экспрессии miR-21 в экспериментальной модели НАСГ у животных способствует активации генов ремоделирования тканей и развития фиброза печени: фактора, индуцируемого гипоксией 1-альфа (HIF-1 α) и протеинкиназы семейства MAP3K [11]. Выявлено, что miR-21 обладает профибротическим эффектом, стимулируя SMAD сигнальный каскад трансформирующего фактора роста (TGF β) — ключевого медиатора фиброгенеза и экспрессию молекулы матричной металлопротеиназы-2 (MMP2), обеспечивающей деградацию молекул межклеточного матрикса и инфильтрацию фибробластов [12]. MiR-122 также участвует в регуляции обмена липидов. В эксперименте на мышях ингибирование экспрессии miR-122 приводило к стимулированию процессов окисления, снижению уровня жирных кислот, а также снижало выраженность стеатоза печени [13].

Коэкспрессия тканевых и циркулирующих микроРНК при НАЖБП. Количество работ, посвященных оценке уровня экспрессии различных микроРНК в биоптатах печени больных НАЖБП, невелико, поскольку они сопряжены с выполнением достаточно травматических инвазивных процедур. В одной из работ, американские ученые с помощью микрочипового анализа идентифицировали 69 из 474 микроРНК, дифференциально выраженных между группами больных с НАСГ ($n=15$) и нормальной гистологией печени ($n=15$). На следующем этапе валидированы несколько микроРНК, ассоциированных по литературным данным с патогенезом НАЖБП: в частности, уровень экспрессии miR-34a был значительно выше, а уровень экспрессии miR-122 ниже в биопсийных материалах печени больных НАСГ ($n=25$, $p<0,05$) [14].

Похожие результаты были получены в работе Pirola C.J. и соавторов: оценка уровня экспрессии miR-122 в биоптатах печени выявила статистически значимое снижение miR-122 в группе больных НАСГ ($n=31$) против здорового контроля ($n=14$) и больных стеатозом ($n=20$). Кроме того, тканевой уровень экспрессии miR-122 отрицательно коррелировал с концентрацией липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) ($r=-0,30$, $p=0,04$), щелочной фосфатазы ($r=-0,42$, $p=0,003$), индексом массы тела (ИМТ) ($r=-0,40$, $p=0,03$) [15].

С целью оценки дифференциальной экспрессии между различными типами биоматериала Н. Miyaaki и соавт. [16] изучали направленность изменения уровня miR-122 в сыворотке крови ($n=52$) и биоптатах печени у больных НАЖБП ($n=67$). Выявлена положительная корреляционная связь между циркулирующими и тканевыми уровнями экспрессии miR-122 ($r=0,461$, $p=0,0005$), а также отмечены статистически значимые различия уровня miR-122 между умеренным (<33% жировой инфильтрации площади печени) и тяжелым стеатозом (>33%) в биоптате печени и сыворотке крови ($p=0,0473$ и $p=0,0491$ соответственно); между низким (F0 или F1) и значимым (> F1) фиброзом ($p=0,0087$ и $p=0,0191$). Таким образом, уровень miR-122 может служить полезным прогностическим маркером фиброза печени у пациентов с НАЖБП.

В ряде работ показано, что НАЖБП повышает риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний независимо от других предикторов и проявлений метаболического синдрома [17]. А. Braga-Boils и соавт. [18] проанализировали тканевой уровень miR-34a и miR-122 в печени больных НАЖБП и риск возникновения внезапной сердечной смерти, связанной с ишемической болезнью сердца (ИБС) ($n=133$) и другой этиологией ($n=106$). Было выявлено статистически значимое повышение уровня экспрессии miR-34a и снижение miR-122 в группе больных с летальным исходом НАЖБП и ИБС против группы сравнения ($p<0,05$), а также отмечена корреляция между уровнем miR-122 и тяжестью НАЖБП в обеих группах больных ($r=-0,489$, $p=0,010$ и $r=-0,439$, $p<0,001$ соответственно). Также, отмечена корреляция между содержанием miR-34a и факторами рисками кардиоваскулярной патологии в группе больных НАЖБП, не связанной с ИБС: С-реактивным белком ($r=0,492$, $p<0,001$), miR-122 с содержанием холестерина ($r=0,458$, $p=0,025$) и соотношением ЛПНП/ЛПВП ($r=0,379$, $p=0,016$).

В целом, полученные данные свидетельствуют о существовании взаимосвязи между развитием и тяжестью данной нозологии и специфичным профилем микроРНК (см. таблицу).

Диагностический потенциал циркулирующих микроРНК при НАЖБП. МикроРНК, присутствующие в биологических жидкостях, известны как «циркулирующие». С целью поиска неинвазивных и малоинвазивных биомаркеров развития и прогрессирования НАЖБП и хронического гепатита С. S. Cermelli и соавт. [19] изучали концентрацию miR-16, miR-21, miR-34a и miR-122 в сыворотке крови больных с НАЖБП ($n=34$) и здоровых добровольцев ($n=19$). Выявлено статистически значимое повышение уровня miR-16, miR-34a, miR-122 у больных с НАЖБП

по сравнению с контрольной группой ($p<0,001$), в то время как уровень miR-21 был сопоставим в обеих группах. Внутри группы НАЖБП при морфологической оценке степени активности и стадии фиброза отмечено статистически значимое повышение уровня miR-34a, miR-122 у пациентов с НАСГ (5-7) против простого стеатоза (1-4). Кроме того, у пациентов с НАЖБП выявлена положительная корреляция между содержанием miR-122 и холестерином ($r=0,36$), ЛПНП ($r=0,44$). Диагностический потенциал miR-122 в развитии стеатоза оценивали с помощью ROC кривой: AUROC составила 0,927; НАСГ против стеатоза – 0,696.

Японские ученые также выявили дисрегуляцию экспрессии miR-21, miR-34a и miR-122 в сыворотке крови больных НАЖБП ($n=92$), уровни которых были значительно выше по сравнению с контрольной группой ($n=311$) ($p<0,001$). Также была отмечена корреляционная взаимосвязь между сывороточным уровнем miR-122 и степенью стеатоза печени [20].

Противоположные данные получили М. Celikbilek и соавт. [21], в работе которых не было выявлено статистически значимого отличия сывороточных уровней miR-122 и -34a между больными НАЖБП ($n=20$) и добровольцами контрольной группы ($n=20$), в то время как miR-181d, -99a, -197 и -146b были значительно ниже по сравнению с контролем ($p<0,05$).

У. Tan и соавт. [22] исследовали три независимых когорты пациентов, включающих в себя 465 человек, и идентифицировали панель циркулирующих miR-122, -1290, -27 и -192, ассоциированных с развитием НАЖБП. Панель обладает достаточно высоким диагностическим потенциалом для исключения пациентов с НАЖБП ($n=152$) и здоровых индивидуумов ($n=90$): AUROC составила 0,866 (95% ДИ 0,804-0,907; чувствительность и специфичность составили 85,5% и 73,3% соответственно) по сравнению с расчетным индексом фиброза FIB-4 (AUROC 0,795, 95% ДИ 0,730-0,860; $p<0,001$; 69,9 и 83,7% соответственно) и уровня miR-122 (AUROC 0,729, 95% ДИ 0,693-0,862; $p<0,001$; 93,4 и 46,7%, соответственно).

Другой группой ученых, с помощью микрочипового анализа из 84 микроРНК было выявлено двукратное повышение экспрессии miR-122, miR-192 и других семейств в группах больных пациентов со стеатозом ($n=16$) и НАСГ ($n=16$) и практически здоровых добровольцев ($n=16$). На втором этапе проводили валидацию отобранных микроРНК: отмечено статистически значимое повышение уровня miR-122 и miR-192 в группе больных НАСГ ($n=47$) против здорового контроля ($n=19$; в 7,2 раза); НАСГ против стеатоза ($n=30$, в 3,1 раза). Высокий уровень сывороточной miR-122 – потенциальный биомаркер НАСГ и фиброза печени (AUROC=0,714, 95% ДИ 0,524-0,861, $p<0,05$ и AUROC=0,613, 95% ДИ 0,458-0,753, $p<0,05$, соответственно) [15].

Аналогичные результаты продемонстрированы Р.Р. Vesker и соавт. [23]. Было выявлено увеличение экспрессии циркулирующих miR-21 и -122, -192 в сыворотке крови больных НАЖБП ($n=137$) по сравнению с контрольной группой ($n=61$). Уровни miR-21, -122 и -192 были статистически значимо выше в группе больных с НАСГ ($n=87$) по сравнению с группами

Диагностические характеристики микроРНК в преваленсе НАЖБП

Болезнь	Микро РНК	Биоматериал	Выявляемые изменения	Характеристики микроРНК в преваленсе НАЖБП	Сравнение с референсными параметрами	Ссылки
НАСГ	микроРНК-34а, -122 и др.	Биоптат печени	↑микроРНК-34а, ↓-122 в НАСГ ($n=25$) против КГ ($n=25$)	нет данных (н/д)	н/д	[14]
НАЖБП/НАСГ	микроРНК-122, -192 и др.	Биоптат печени	↓микроРНК-122, -192 в НАСГ ($n=31$) против КГ ($n=14$) и больных с простым стеатозом ($n=20$)	н/д	Корреляция между уровнями микроРНК-122 и ХС-ЛПНП, щелочной фосфатазы и индексом массы тела (ИМТ) ($r=-0,30$; $-0,42$; $-0,40$ соотв.)	[15]
НАЖБП	микроРНК-122	Биоптат печени	↓микроРНК-122 в НАЖБП с умеренным стеатозом (<33% жировой инфильтрации площади печени) против тяжелого стеатоза (>33%); умеренным (F0 или F1) против значимого (> F1) фиброза в биоптатах печени ($n=67$)	н/д	н/д	[16]
НАЖБП/НАСГ/ИБС	микроРНК-34а, -122 и др.	Биоптат печени	↑микроРНК-34а, ↓-122 в группе больных с летальным исходом НАЖБП с ИБС ($n=133$) против НАСГ без ИБС ($n=106$)	н/д	Корреляция между уровнем микроРНК-122 и тяжестью НАЖБП в обеих группах больных ($r=-0,489$ и $r=-0,439$ соотв.); между микроРНК-34а и С-реактивным белком, микроРНК-122 с содержанием холестерина и соотношением ЛПНП/ЛПВП ($r=0,492$; $0,458$; $0,379$ соотв.)	[18]
НАЖБП/НАСГ	микроРНК-16, -21, -34а, -122	Сыворотка	↑микроРНК-16, -34а, -122 в НАЖБП ($n=34$) против КГ ($n=19$); ↑микроРНК-34а, -122 в НАСГ (5-7 баллов) против простого стеатоза (1-4 баллов) внутри группы НАЖБП по морфологической оценке степени активности и стадии фиброза, предложенной Brant E.M.	Высокий уровень микроРНК-122 сопряжен с развитием стеатоза: AUC 0,927 (стеатоз против КГ); AUC 0,696 (НАСГ против стеатоза)	Корреляция между уровнями микроРНК-122 и общим холестерином, ХС-ЛПНП ($r=0,36$, $r=0,44$ соотв.)	[19]
НАЖБП	микроРНК-21, -34а, -122 и др.	Сыворотка	↑микроРНК-21, -34а, -122 в НАЖБП ($n=92$) против КГ ($n=311$)	н/д	н/д	[20]
НАЖБП/НАСГ	микроРНК-34а, -122 и др.	Сыворотка	Уровни микроРНК-34а и -122 сопоставимы в НАЖБП ($n=20$) и КГ ($n=20$)	н/д	н/д	[21]
НАЖБП	микроРНК-122 и др.	Сыворотка	↑микроРНК-122, -1290, -27 и -192 в НАЖБП ($n=152$) против КГ ($n=90$)	Панель микроРНК сопряжена с НАЖБП: AUC 0,866 (95% ДИ 0,804-0,907; чувствительность и специфичность составили 85,5% и 73,3% соотв.), для микроРНК-122 AUC составила 0,729 (95% ДИ 0,693-0,862; $p<0,001$; 93,4% и 46,7%, соотв.)	н/д	[22]
НАЖБП/НАСГ	микроРНК-122, -192 и др.	Сыворотка	↑микроРНК-122, -192 в НАСГ ($n=47$) против КГ ($n=19$) и больных с простым стеатозом ($n=30$)	Высокий уровень микроРНК-122 сопряжен с НАСГ и фиброзом печени (AUROC=0,714, 95% ДИ 0,524-0,861, $p<0,05$ и AUROC=0,613, 95% ДИ 0,458-0,753, $p<0,05$ соотв.)	Положительная корреляция между уровнями микроРНК-122, -192 и активностью АЛТ, АСТ, Гамма-ГТ, концентрацией триглицеридов, цитокератином-18	[15]
НАЖБП	микроРНК-122	Сыворотка	↓микроРНК-122 в НАЖБП с умеренным стеатозом (<33% жировой инфильтрации площади печени) против тяжелого стеатоза (>33%); умеренным (F0 или F1) против значимого (> F1) фиброза в сыворотке крови ($n=52$)	н/д	н/д	[16]

Продолжение таблицы см. на следующей стр.

Диагностические характеристики микроРНК в преваленте НАЖБП (продолжение)

НАЖБП/ НАСГ	микроРНК-21, -122, -192 и др.	Сыворотка	↑микроРНК-21, -122, -192 в НАСГ ($n=87$) против КГ ($n=61$) и больных с простым стеатозом ($n=50$)	Панель микроРНК + АЛТ + цитокератин-18 сопряжены с НАСГ: AUROC составила 0,83 (95% ДИ 0,754-0,908, $p<0,001$) (НАСГ против простого стеатоза)	Корреляция между уровнями микроРНК-122 и -192 и активностью АЛТ ($r=0,53$ и $r=0,45$), цитокератина-18 ($r=0,48$ и $r=0,36$ соотв.)	[23]
НАЖБП	микроРНК-103	Сыворотка	↑микроРНК-103 в НАЖБП ($n=50$) против КГ ($n=30$)	Повышенный уровень miR-103 является фактором развития НАЖБП: ОШ 2,411 (ДИ 95% 1,250-4,652, $p=0,009$)	Корреляция между уровнями микроРНК-103 и индексом инсулинорезистентности (НОМА-IR) ($r=0,881$), триглицеридами ($r=0,774$) и ИМТ ($r=0,878$)	[24]
НАЖБП	микроРНК-21, -34а, -122 и др.	Сыворотка	↑микроРНК-34а, -122 в НАЖБП ($n=28$) против КГ ($n=36$), уровень микроРНК-21 сопоставим в обеих группах	Высокие уровни микроРНК-34а и 122 сопряжены с НАЖБП: AUROC=0,781 (95% ДИ 0,663-0,899, $p=0,001$) и 0,858 (95% ДИ 0,769-0,947, $p=0,001$) соотв.	Корреляция между уровнями микроРНК-34а и ЛПНП ($r=0,44$), триглицеридов ($r=0,43$). Корреляции исследуемых микроРНК с морфологическими признаками НАЖБП не выявлено	[25]
НАЖБП/ НАСГ/ ГЦК	микроРНК-122	Сыворотка	↑микроРНК-122 в группе больных с НАЖБП без ГЦК против НАЖБП с ГЦК стадий I-II ($p=0,003$), III ($p=0,001$), однако уровни сопоставимы на стадиях 0 и IV	н/д	Корреляции между содержанием miR-122 и концентрациями АСТ, АЛТ, Гамма-ГТ, ферритина и ИМТ ($r=0,566$, $r=0,632$, $r=0,282$, $r=0,278$, $r=0,239$ соотв.)	[26]
НАЖБП	микроРНК-7, -103, -145 и др.	Плазма	↓микроРНК-145 в НАЖБП с ожирением ($n=20$, ИМТ>30) против без ожирения ($n=24$, ИМТ<30)	н/д	Положительная корреляция между уровнем микроРНК-103 и концентрациями холестерина и ЛПНП, для микроРНК-7 - отрицательная	[27]
НАЖБП/ НАСГ/ ХГВ	микроРНК-16, -21, 34а, -122, -192 и др.	Сыворотка	↑микроРНК-16, -21, 34а, -122, -192 в группах больных с НАЖБП ($n=48$) и ХГВ ($n=26$) против КГ ($n=37$). Внутри НАЖБП: ↑микроРНК-34а, -122, -192 в НАСГ ($n=31$) против простого стеатоза ($n=17$)	Высокие уровни микроРНК-34а и -16 сопряжены с развитием НАСГ и фиброза печени: AUROC 0,811 (95% ДИ 0,670-0,953, $p<0,05$), чувствительность и специфичность составили 70,4 и 57,9% соотв. и 0,716 (95% ДИ 0,551-0,882, $p<0,05$) соотв.	Корреляции между уровнями микроРНК-34а и -122 со степенью стеатоза ($r=0,302$ и 0,470); воспалительной активностью ($r=0,445$, и 0,517) микроРНК-122 с баллирующими гепатоцитами ($r=0,447$); лобулярным воспалением ($r=0,552$); между уровнем микроРНК-16 и стадией фиброза печени ($r=0,350$)	[28]
НАЖБП	микроРНК-21, -34а, -103, -122 и др.	Сыворотка	↑микроРНК-21 и -122 в группе детей с пубертатным ожирением и НАЖБП ($n=20$) против КГ ($n=10$)	Наибольшая диагностическая ценность в развитии НАЖБП выявлена для микроРНК-122 (AUROC 0,983)	Корреляция между содержанием микроРНК-21 и -103а с ИМТ ($r=0,40$ и $r=0,44$); микроРНК-34а с АСТ ($r=0,45$); микроРНК-122 с АЛТ и АСТ ($r=0,60$ и $r=0,50$ соотв.)	[29]
НАЖБП	микроРНК-122	Сыворотка	↑микроРНК-122 в НАЖБП у детей препубертатного возраста с ожирением (немецкая популяция, $n=71$ и итальянская популяция, $n=45$) против КГ (словенская популяция, $n=31$)	Высокий уровень miR-122 ассоциирован с НАЖБП: для немцев площадь под кривой в ROC-анализе составила 0,77, для итальянцев – 0,54	Корреляция уровня miR-122 с концентрациями АЛТ, АСТ, ГГТ и цитокератина СК-18	[30]

стеатоза ($n=50$) и здорового контроля (все $p<0,05$); в группе стеатоза против контрольной группы – только для miR-122 ($p<0,05$). Выявлена ассоциативная взаимосвязь между уровнями miR-122 и miR-192 с активностью АЛТ ($r=0,53$ и $r=0,45$, все $p<0,0001$), с содержанием в сыворотке фрагментов белка-филамента цитокератина-18 (СК18-Asp396) ($r=0,48$ и $r=0,36$, все $p<0,0001$), образующихся при его расщеплении активированными каспазами из гепатоцитов при апоптозе.

Диагностический потенциал комбинации исследуемых показателей при развитии НАСГ (против стеатоза) оценивали с помощью ROC кривой: AUROC составила 0,83 (95% ДИ 0,754-0,908, $p<0,001$).

Патогенез НАЖБП тесно связан с синдромом инсулинорезистентности (ИР), вследствие которого в печени накапливаются триглицериды и формируется жировой гепатоз — первый этап или «толчок» заболевания. Q. Xu и соавт. [24] изучали концентрации miR-

103 и биомаркеров липидного и углеводного обмена. Выявлено статистически значимое повышение уровня miR-103 в группе больных НАЖБП ($n=50$) по сравнению с добровольцами контрольной группы ($n=30$). Отмечена положительная корреляция между уровнями miR-103 и индексом инсулинорезистентности (НОМА-IR) ($r=0,881$), триглицеридами ($r=0,774$) и ИМТ ($r=0,878$). Повышенный уровень miR-103 является фактором развития НАЖБП: ОШ 2,411 (ДИ 95% 1,250-4,652, $p=0,009$).

В работе N.C. Salvoza и соавт. [25] отмечено статистически значимое увеличение циркулирующих miR-34a и miR-122 в сыворотке больных НАЖБП ($n=28$) по сравнению с контрольной группой ($n=36$), в то время как уровень miR-21 был сопоставим в обеих группах. Выявлена положительная корреляция между концентрациями miR-34a и ЛПНП ($r=0,44$), триглицеридов ($r=0,43$). Однако не выявлено корреляции исследуемых микроРНК с морфологическими признаками НАЖБП. Высокие уровни сывороточных miR-34a (AUROC=0,781, 95% ДИ 0,663-0,899, $p=0,001$) и miR-122 (AUROC=0,858, 95% ДИ 0,769-0,947, $p=0,001$) – потенциальные биомаркеры НАЖБП.

В работе N. Akuta и соавт. [26] изучалась диагностическая роль miR-122 в развитии НАЖБП и ГЦК. Ученые изучали уровень экспрессии miR-122 в сыворотке крови 305 больных НАЖБП ($n=278$) и ГЦК ($n=27$). Было выявлено статистически значимое различие уровня miR-122 среди групп по гистологической классификации НАЖБП: степени стеатоза (вовлечено 5-33%/ >33-66, >66% гепатоцитов, все $p<0,001$); баллонирования гепатоцитов (баллонизирующих клеток нет/ мало/ выраженное баллонирование, все $p<0,001$); лобулярного воспаления (очагов воспаления нет/ <2 / 2-4/ >4 очагов в поле зрения ($\times 200$), все $p<0,001$); стадиям фиброза (0/ 1/ 2/ 3/ 4, все $p<0,001$). Выявлены корреляции между содержанием miR-122 с концентрациями АСТ, АЛТ, γ -ГТ, ферритина и ИМТ ($r=0,566$, $r=0,632$, $r=0,282$, $r=0,278$, $r=0,239$, все $p<0,001$ соответственно). Уровень miR-122 статистически значимо выше в группе больных с НАЖБП без ГЦК по сравнению с НАЖБП с ГЦК стадий I-II ($p=0,003$), III ($p=0,001$), однако были сопоставимы на стадиях 0 и IV.

R. Mehta и соавт. [27] анализировали экспрессию циркулирующих микроРНК больных НАЖБП с ожирением ($n=20$, ИМТ>30) и без него ($n=24$, ИМТ<30). Было выявлено значительное снижение уровня экспрессии miR-145 и других типов в плазме больных с ожирением ($p<0,05$). Корреляционный анализ выявил положительную связь между уровнем miR-103 и концентрациями холестерина и ЛПНП, в то время как для miR-7 выявлена отрицательная корреляция с теми же параметрами.

В работе X.L. Liu [28] изучали дифференциальную экспрессию уровня miR-16, -21, -34a, -122, -192 и др. при НАЖБП в китайской популяции. Выявлена значительная экспрессия miR-16, -21, -34a, -122 и -192 в группе больных с хроническим гепатитом В (ХГВ) ($n=26$) по сравнению с НАЖБП ($n=48$) и группой здоровых добровольцев ($n=37$). Только уровень miR-34a был дифференциально экспрессирован между группами НАЖБП и ХГВ (в 2 раза выше). Внутри группы

НАЖБП отмечено изменение уровня не только между НАЖБП и контрольной группами, но также между НАСГ (31) и НАЖБП ($n=17$) для miR-34a, -122 и -192 (все $p<0,05$). Кроме того, выявлены корреляционные взаимосвязи miR-34a и miR-122 со степенью стеатоза ($r=0,302$ и $0,470$, $p<0,05$); воспалительной активностью ($r=0,445$, и $0,517$, $p<0,05$) miR-122 с баллонизирующими гепатоцитами ($r=0,447$, $p<0,01$); лобулярным воспалением ($r=0,552$, $p<0,01$); уровня miR-16 – с стадией фиброза ($r=0,350$, $p<0,05$). Высокий уровень miR-34a ассоциирован с НАЖБП (против контрольной группы): AUROC 0,811 (95% ДИ 0,670-0,953, $p<0,05$), чувствительность и специфичность составили 70,4 и 57,9% соответственно и превосходит диагностическую ценность активности АЛТ, СК-18, шкал оценки FIB-4 и APRI. Высокий уровень miR-16 – биомаркер фиброза печени: AUROC 0,716 (95% ДИ 0,551-0,882, $p<0,05$).

M.D. Thompson и соавт. [29] изучали уровни экспрессии микроРНК у детей с пубертатным ожирением и НАЖБП ($n=20$, средний возраст составил $13,2\pm 3,1$) по сравнению с контрольной группой ($n=10$, средний возраст составил $13,8\pm 2,1$). Для анализа были выбраны 20 циркулирующих микроРНК, дифференциально экспрессирующихся у взрослых людей при НАЖБП. Уровни 16 из 20 микроРНК (miR-21, -34a, -103a, -122 и др.) показали двукратное изменение по сравнению с контрольной группой, наиболее значительное из которых отмечено miR-122. Наибольшая диагностическая ценность в развитии НАЖБП выявлена для miR-122 (AUROC 0,983). Также отмечена корреляция между содержанием miR-21 и -103a с ИМТ ($r=0,40$ и $r=0,44$); miR-34a с АСТ ($r=0,45$, $p=0,047$); miR-122 с АЛТ и АСТ ($r=0,60$ и $r=0,50$; $r=0,006$ и $r=0,02$ соответственно).

В недавнем многоцентровом исследовании было показано, что циркулирующая miR-122 была статистически значимо повышена в двух когортах пациентов с НАЖБП у детей препубертатного возраста с ожирением (немецкая популяция, $n=71$ и итальянская популяция, $n=45$) по сравнению с контрольной группой (словенская популяция, $n=31$). Также выявлена положительная корреляция сывороточного уровня miR-122 с концентрациями АЛТ, АСТ, ГГТ и цитокина СК18 в группах с НАЖБП. Высокий уровень miR-122 был ассоциирован с НАЖБП (против контрольной группы): для немецкой популяции площадь под кривой в ROC-анализе составила 0,77, для итальянской – 0,54 [30].

Заключение. Прогноз и лечение хронических заболеваний печени в значительной степени зависят от выраженности гистологических изменений. Хотя биопсия печени остается эталонным методом для постановки диагноза, её ограничения (инвазивность, субъективизм патоморфологической оценки и зависимость от точности взятия биоптата) снижают частоту ее применения в рутинной клинической практике и стимулируют поиск новых неинвазивных и малоинвазивных подходов. При этом основное внимание уделяется вопросу, могут ли данные методы не только обнаружить клинически значимые формы НАЖБП, но и коррелировать с морфологической оценкой степени активности и стадии стеатоза и фиброза. Накопленные данные свидетельствуют о том, что микроРНК являются важными регуляторами

липидного обмена. В то же время, так как каждая микроРНК имеет несколько мишеней, и один ген может регулироваться несколькими микроРНК, преждевременно рассматривать любую отдельную микроРНК как самостоятельный маркер исключительно для жировых заболеваний печени. Тем не менее, с увеличением числа открытий новых микроРНК, а также установления функции уже известных специфических микроРНК в патогенезе заболевания, растет и понимание возможностей использования конкретных микроРНК в клинической практике. Таким образом, в будущем определение профилей экспрессируемых микроРНК, вместе с биохимическими и другими лабораторными показателями, может лечь в основу интегральной шкалы оценки стадии течения заболевания печени.

В последние годы все большее количество микроРНК было предложено в качестве потенциальных биомаркеров НАЖБП. Наибольшая диагностическая и прогностическая ценность была продемонстрирована для miR-21, miR-34a, miR-103, miR-122, miR-145, miR-192 и других семейств.

Важно отметить, что в большинстве работ пациентов с НАЖБП сравнивали с контрольными группами здоровых лиц. Противоречивые результаты некоторых исследований подтверждают необходимость дальнейшего изучения патогенетического механизма развития заболевания и вклад конкретных микроРНК. В то же время, уже сейчас можно утверждать, что некоторые микроРНК являются крайне перспективным малоинвазивным диагностическим инструментом.

На сегодняшний день количественное определение различных микроРНК не может быть использовано в качестве основного, неинвазивного диагностического теста для диагностики неалкогольной жировой болезни печени. Необходимо проведение масштабных клинических исследований для определения пороговых значений и соответствующих диагностических характеристик, циркулирующих микроРНК в качестве биомаркера НАЖБП. Кроме того, должна быть проведена работа по созданию референсного метода для выявления микроРНК, который бы позволил стандартизировать исследования для оценки базовых значений этих биомаркеров в различных группах населения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100»

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Demir M., Lang S., Steffen H.M. Nonalcoholic fatty liver disease: Current status and future directions. *J. Dig. Dis.* 2015;16 (10): 541-57.
- Lewis J., Mohanty S. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Review and Update. *Dig. Dis. Sci.* 2010; 55: 560-78.
- Sumida Y., Nakajima A., Itoh Y. Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *WJG.* 2014; 20(2): 475-85.
- Castera L., Pinzani M. Non-invasive assessment of liver fibrosis: are we ready? *Lancet.* 2010 Apr 24;375(9724):1419-20. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology.* 2016; 64:1388-1402.
- EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *Journal of Hepatology.* 2015; 63(1): 237-64.
- Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116(2): 281-97.
- Lakner A.M, Bonkovsky HL, Schrum LW. microRNAs: fad or future of liver disease. *WJG.* 2011;17: 2536-42.
- Castro R.E., Ferreira D.M., Afonso M.B., Borralho P.M., Machado M.V., Cortez-Pinto H., Rodrigues C.M. Mir-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 2013;58:119-25.
- Ding J., Li M., Wan X., Jin X., Chen S., Yu C., Li Y. Effect of mir-34a in regulating steatosis by targeting PPAR α expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.* 2015; 5.
- Singaravelu R., Quan C.M., Powdrill M.H., Shaw T.A., Srinivasan P., Lyn R.K. et al. MicroRNA-7 mediates cross-talk between metabolic signaling pathways in the liver. *Sci Rep.* 2018; 8: 361.
- Csak T., Bala S., Lippai D., Satishchandran A., Catalano D., Kodys K. et al. MicroRNA-122 regulates hypoxia-inducible factor-1 and vimentin in hepatocytes and correlates with fibrosis in diet-induced steatohepatitis. *Liver Int.* 2015; 35: 532-41.
- Marquez R. T., Bandyopadhyay S., Wendlandt E. B. et al. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Lab. Invest.* 2010; 90: 1727-36.
- Esau C., Davis S., Murray S.F., et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 2006; 3: 87-98.
- Cheung O., Puri P., Eicken C., Contos M.J., Mirshahi F., Maher J.W. et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology.* 2008; 48:1810-20.
- Pirola C.J., Gianotti T.F., Castaño G.O., Mallardi P., San Martino J., Ledesma M.M.G.L. et al. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut.* 2015; 64(5): 800-12.
- Miyaaki H., Ichikawa T., Kamo Y., Taura N., Honda T., Shibata H., Mizuno M., Fornari F., Gramantieri L., Bolondi L., Nakao K. Significance of serum and hepatic microRNA-122 levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2014; 34(7): 2-3.
- Haring R., Wallaschofski H., Nauck M., et al. *Hepatology.* 2009; 50: 1403-11.
- Braza-Boils A., Mari-Alexandre J., Molina P., Arnau M.A., Barceló-Molina M., Domingo D. et al. Deregulated hepatic microRNAs underlie the association between non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *Liver Int.* 2016; 36(8): 1221-9.
- Cermelli S., Ruggieri A., Marrero J.A., Ioannou G.N., Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2011; 6(8): 5-7.
- Yamada H., Suzuki K., Ichino N., Ando Y., Sawada A., Osakabe K. et al. Associations between circulating microRNAs (miR-21, miR-34a, miR-122 and miR-451) and non-alcoholic fatty liver. *Clin. Chim. Acta.* 2013; 424: 99-103.
- Celikbilek M., Baskol M., Taheri S., Deniz K., Dogan S., Zararsiz G. et al. Circulating microRNAs in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *W.J. H.* 2014; 6(8): 613-20.
- Tan Y., Ge G., Pan T., Wen D., Gan J. A pilot study of serum microRNAs panel as potential biomarkers for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2014; 9(8): 4-10.
- Becker P.P., Rau M., Schmitt J., Malsch C., Hammer C., Bantel H., Müllhaupt B, Geier A. Performance of Serum microRNAs -122, -192 and -21 as Biomarkers in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One.* 2015; 10(11): 5-12.
- Xu Q., Li Y., Shang YF, Wang HL, Yao MX. miRNA-103: molecular link between insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* 2015;21(2): 511-6.
- Salvoza N.C., Klinzing D.C., Gopez-Cervantes J., Baclig M.O.. Association of Circulating Serum miR-34a and miR-122 with Dyslipidemia among Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One.* 2016; 11(4): 4-9.
- Akuta N., Kawamura Y., Suzuki F., Saitoh S., Arase Y., Kunimoto H. et al. Impact of circulating miR-122 for histological features and hepatocellular carcinoma of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. *Hepatol. Int.* 2016; 10(4): 647-56.
- Mehta R., Otgonsuren M., Younoszai Z., Allawi H, Raybuck B., Younoszi Z. Circulating miRNA in patients with non-alcoholic fatty liver disease and coronary artery disease. *BMJ Open Gastroenterol.* 2016; 3(1): 2-6.
- Liu X.L., Pan Q., Zhang R.N., Shen F, Yan S.Y., Sun C. et al. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(44): 9844-52.
- Thompson M.D., Cismowski M.J., Serpico M., Pusateri A., Brigstock D.R. Elevation of circulating microRNA levels in obese children compared to healthy controls. *Clin. Obes.* 2017; 7(4): 216-21.
- Brandt S., Roos J., Inzaghi E., Kotnik P., Kovac J., Battelino T. et al. Circulating levels of miR-122 and nonalcoholic fatty liver disease in pre-pubertal obese children. *Pediatr. Obes.* 2018; 13(3): 75-82.

Поступила 01.09.19

Принята к печати 18.10.19

Пушкин А.С.^{1,3,4}, Ахмедов Т.А.^{1,3}, Волчков В.А.^{2,3}, Рукавишникова С.А.^{1,3}, Ким С.В.^{3,4}

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ГИПЕРГЛИКЕМИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА НА ИСХОДЫ ОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМА

¹ГБОУ ВПО Первый Санкт-Петербургский медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

²Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Россия;

³СПб ГБУЗ Городская многопрофильная больница № 2, 194354, Санкт-Петербург, Россия;

⁴Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110, Санкт-Петербург, Россия

Острый коронарный синдром (ОКС) у пациентов пожилого и старческого возраста имеет ряд особенностей и требует особого внимания при оказании медицинской помощи. Течение заболевания у таких пациентов сопряжено со значительной коморбидностью и атипичной симптоматикой. Сахарный диабет является частым сопутствующим заболеванием пациентов с ОКС. Проведено ретроспективное когортное исследование, обследовано 2945 пациентов с ОКС. Пациенты были разделены на три возрастные группы: группа 1 – пациенты в возрасте от 35 до 59 лет; группа 2 – пациенты в возрасте от 60 до 74 лет; группа 3 – пациенты от 75 лет и старше. Количество пациентов с концентрацией глюкозы выше 11,1 ммоль/л значимо выше в группах пожилого и старческого возраста, чем в группе пациентов от 35 до 59 лет ($p < 0,05$). Количество пациентов с нарушениями функций почек после введения контрастного вещества в обследуемой группе с ОКС увеличивалось с увеличением возраста. Значимое отличие выявлено между группами среднего и старческого возраста, а также между группами пожилого и старческого возраста ($p < 0,05$). Выявлено увеличение относительного количества пациентов с летальными исходами в группах со значительным увеличением уровня глюкозы при первичном обследовании. Доказана связь между патологическим уровнем глюкозы и повторными инфарктами миокарда. Представленная статистическая картина позволяет говорить об особенно высоком риске повторных сердечно-сосудистых событий среди пациентов с ОКС и с патологическим уровнем глюкозы. Корреляция между количеством летальных исходов и уровнем глюкозы при первичном обследовании позволяет применять исследование уровня глюкозы как дополнительный критерий в стратификации рисков и исходов у пациентов с ОКС.

Ключевые слова: глюкоза; острый коронарный синдром; пожилой и старческий возраст.

Для цитирования: Пушкин А.С., Ахмедов Т.А., Волчков В.А., Рукавишникова С.А., Ким С.В. Оценка влияния гипергликемии у пациентов пожилого и старческого возраста на исходы острого коронарного синдрома. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12): 730-735 DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-730-735>

Pushkin A.S.^{1,3,4}, Akhmedov T.A.^{1,3}, Volchkov V.A.^{2,3}, Rukavishnikova S.A.^{1,3}, Kim S.V.^{3,4}

EVALUATION OF HYPERGLYCEMIA IMPACT ON OUTCOMES OF ACUTE CORONARY SYNDROME IN ELDERLY AND SENILE PATIENTS

¹I.P. Pavlov First Saint- Petersburg State Medical University, 197022, St.Petersburg, Russian Federation;

²St. Petersburg State University, 199034, St.Petersburg, Russian Federation;

³St.Petersburg State Budgetary Healthcare Institution «City Multi-field Hospital № 2», 194354, St.Petersburg, Russian Federation;

⁴St.Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 197110, St.Petersburg, Russia

Acute coronary syndrome (ACS) in elderly and senile patients has a number of features and requires special attention to providing medical care. These patients is associated with significant comorbidity and atypical symptoms in the course of the disease. Diabetes mellitus is a common background disease in patients with ACS. A retrospective cohort study was performed, 2945 patients with ACS were examined. Patients were divided into three age groups: group 1 – patients aged 18 to 63 years; group 2 – patients aged 64 to 75 years; group 3 – patients older than 75 years. Number of patients with glucose concentrations above 11.1 mmol/L is significantly higher in elderly and senile groups than in group of patients from 35 to 59 years old. The number of patients with impaired renal function after administration of a contrast medium in the study group with ACS increased with increasing age. Significant difference was revealed between the middle and senile age groups, as well as between the elderly and senile age groups. An increase in the relative number of patients with fatal outcomes in groups with a significant increase in glucose levels was revealed. The connection between the pathological level of glucose and repeated myocardial infarction is proved. Conclusion. The presented statistical picture suggests a particularly high risk of recurring cardiovascular events among patients with ACS and pathological glucose levels. The correlation between the number of deaths and glucose levels during the initial examination allows the use of glucose tests as an additional criterion in the stratification of risks and outcomes in patients with ACS.

Key words: glucose; acute coronary syndrome; elderly and senile patients.

For citation: Pushkin A.S., Akhmedov T.A., Volchkov V.A., Rukavishnikova S.A., Kim S.V. Evaluation of hyperglycemia impact on outcomes of acute coronary syndrome in elderly and senile patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (12): 730-735. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-730-735>

For correspondence: Pushkin A.C., PhD, Head of Emergency Lab Department of Clinical Diagnostic Laboratory, St.-Petersburg State Budgetary Healthcare Institution «City Multi-field Hospital № 2», Associate Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a course of Molecular Medicine, I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University. E-mail: pushkin-doc@mail.ru

Information about authors:

Pushkin A.S., <https://orcid.org/0000-0003-2875-9521>

Akhmedov T.A., <https://orcid.org/0000-0002-3105-4322>

Volchkov V.A., <https://orcid.org/0000-0002-5664-7386>

Rukavishnikova S.A., <https://orcid.org/0000-0002-8161-2425>

Kim S.V., <https://orcid.org/0000-0002-9830-4605>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 10.10.2019
Accepted 18.10.2019

Введение. Острый коронарный синдром (ОКС) у пациентов пожилого и старческого возраста имеет ряд особенностей и требует особого внимания при оказании медицинской помощи [1]. Течение заболевания у таких пациентов, как правило, сопряжено со значительной коморбидностью и атипичной симптоматикой [2]. Одним из наиболее частых сопутствующих заболеваний пациентов с ОКС является сахарный диабет (СД) [3]. В клинических рекомендациях по ведению пациентов с ОКС как российского, так и европейского общества кардиологов не так много информации об указанных группах пациентов [4, 5]. Однако, большинство авторов сходится во мнении о необходимости целевого подхода к пациентам с ОКС, имеющим в анамнезе СД или выявленную при экстренной госпитализации гипергликемию [6].

Обзоры литературных источников сообщают о различной вероятности развития неблагоприятных исходов у пациентов с сахарным диабетом и гипергликемией на фоне стрессового фактора в результате развития острого коронарного синдрома [3, 7]. Неоднозначность выводов исследователей требует дальнейшего наблюдения и получения дополнительной информации о клинических исходах, особенно в группах пациентов пожилого и старческого возраста, как наиболее уязвимых.

Для надлежащего оказания медицинской помощи требуется тщательный гликемический контроль при поступлении пациентов с ОКС, что позволит правильно выбрать тактику ведения пациентов и предупредить развитие необратимых последствий.

Материал и методы. Проведено ретроспективное когортное исследование, в рамках которого проанализированы истории болезней пациентов, проходивших стационарное лечение в период 2017 – 2018 г. с диагнозом направления «Острый коронарный синдром» в СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2». Пациенты были разделены на три возрастные группы: группа 1 – пациенты в возрасте от 35 до 59 лет (средний возраст); группа 2 – пациенты в возрасте от 60 до 74 лет (пожилой возраст); группа 3 – пациенты от 75 лет и старше (старческий возраст). Критериями исключения были пациенты с досуточной летальностью, с наличием онкологических или системных аутоиммунных заболеваний в анамнезе. Также в исследование не включали пациентов, требующих дополнительных методов хирургического лечения кроме коронароангиографии, баллонной ангиопластики, стентирования, аортокоронарного шунтиро-

вания. Всем пациентам наряду с другими методами обследования проводилось определение уровня глюкозы и креатинина в плазме крови при поступлении в стационар и в динамике при необходимости. Уровень глюкозы и креатинина определяли на автоматическом биохимическом анализаторе. Глюкозу в плазме крови определяли гексокиназным методом. Уровень креатинина определяли кинетическим методом Яффе со щелочным пикратом.

Исследуемыми конечными точками приняты летальный исход и повышение уровня креатинина в плазме крови более чем на 44,2 мкмоль/л или на 25% от исходного уровня в течение 48 – 72 ч после применения контрастного вещества в результате проведения коронароангиографии.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась при помощи пакета программ статистической обработки «Statistica 10.0» и программы «Microsoft Office Excel». Все показатели исследуемых проверялись на соответствие нормальному распределению с применением критерия Шапиро – Уилка. Описательная статистика непрерывных количественных величин осуществлялась при нормальном распределении данных выборки в виде среднего значения и 95% ДИ или в виде медианы и значений 25% нижнего и 75% верхнего квартилей при ненормальном распределении. Для определения различий между несколькими несвязанными группами применяли однофакторный дисперсионный анализ с использованием Н-критерия Краскела – Уоллиса, а также попарное (множественное) сравнение групп с использованием критерия Дункана для выборок с различным объемом. Вычисляли медианы и перцентили в интервалах 27 – 75% для исключения редких и выпадающих из общей массы значений. Пороговое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы. В том случае, если полученное значение критерия χ^2 превышало критическое, делался вывод о наличии статистической взаимосвязи между изучаемым фактором риска и исходом при соответствующем уровне значимости.

Результаты. Из 2945 пациентов с предварительным диагнозом ОКС в результате применения кри-

териев исключения в исследуемую когорту было включено 2449 пациентов. В том числе 157 (6%) с окончательным диагнозом повторный инфаркт миокарда и 103 пациента (4%) с летальными исходами. Хирургические методы лечения применялись у 1874 пациентов, что составляет большинство случаев ОКС (76%). Коронароангиографическое исследование проводилось у 63% пациентов ($n=1512$). Баллонная ангиопластика и стентирование коронарных артерий проводились у 927 (38%) пациентов. Аортокоронарное шунтирование – у 72 пациентов (3%). Прочие операции выполнялись в менее чем 2% случаев.

Для оценки пациентов с ОКС все три возрастные группы были распределены на три подгруппы, каждая согласно уровню глюкозы при первичном обследовании (табл. 1). Подгруппа А – пациенты с концентрацией глюкозы ниже 7,0 ммоль/л; подгруппа В – пациенты с концентрацией глюкозы от 7,0 ммоль/л до 11,1 ммоль/л; подгруппа С – пациенты с концентрацией глюкозы более 11,1 ммоль/л. Учитывая отсутствие нормального распределения в некоторых группах, для всех были вычислены медианы и значения 25% нижнего и 75% верхнего квартилей. Опорные уровни глюкозы 7,0 и 11,1 ммоль/л были взяты на основании клинических рекомендаций по диагностике и лечению сахарного диабета [8].

Количество пациентов в подгруппе с концентрацией глюкозы менее 7 ммоль/л с увеличением возраста уменьшается, и группы статистически значимо отличаются друг от друга ($p<0,05$). В подгруппе с концентрацией глюкозы от 7,0 ммоль/л до 11,1 ммоль/л напротив происходит увеличение количества пациентов с увеличением их возраста, группы статистически значимо отличаются друг от друга ($p<0,05$). Количество пациентов с концентрацией глюкозы выше 11,1 ммоль/л значимо выше в группах пожилого (от 60 до 74 лет) и старческого возраста (≥ 75 лет), чем в группе пациентов среднего возраста (от 35 до 59 лет) ($p<0,05$). Достоверного различия по количеству пациентов с концентрацией глюкозы выше 11,1 ммоль/л между возрастными группами 2 и 3 не выявлено ($p=0,143$).

Для оценки наличия достоверного отличия между группами по концентрации глюкозы произвели однофакторный дисперсионный анализ с использованием Н-критерия Краскела – Уоллиса, а также попарное (множественное) сравнение групп с использованием

критерия Дункана для выборок с различным объемом. Результаты анализа представлены на рисунке.

Обращает на себя внимание отсутствие статистически значимого отличия в уровне глюкозы в подгруппах А и В. В свою очередь значимое отличие выявлено в подгруппе С между всеми тремя возрастными группами пациентов. Концентрация глюкозы при первичном обследовании значимо выше у пациентов пожилого и старческого возраста, чем в группе пациентов среднего возраста.

Креатинин. Количество пациентов с повышением уровня креатинина в плазме крови более чем на 44,2 мкмоль/л или на 25% от исходного уровня в течение 48 – 72 ч после применения контрастного вещества при исходном уровне в пределах референсного диапазона (для мужчин – 64 – 111 мкмоль/л и 50 – 98 мкмоль/л для женщин) составило 82 пациента (5% от 1512 пациентов с КАГ). В том числе, в группе 1 (35 – 59 лет) – 14 пациентов (3 %); в группе 2 (60 – 74) – 34 (5%); в группе 3 (≥ 75 лет) – 34 пациента (10%) (табл. 2).

Необходимо отметить, что с возрастом количество пациентов с нарушениями функций почек после введения контрастного вещества увеличилось. Значимое отличие выявлено между группами среднего (35 – 59 лет) и старческого возраста (≥ 75 лет), критерий χ^2 составил 16,322 ($p<0,001$), а также, между группами пожилого (60 – 74 лет) и старческого возраста (≥ 75 лет), критерий χ^2 составил 10,297 ($p=0,002$).

В числе пациентов с неблагоприятным исходом по уровню креатинина было 49 (3%) среди пациентов с уровнем глюкозы менее 7,0 ммоль/л при поступлении; 28 (4 %) среди пациентов с глюкозой от 7,0 до 11,1 ммоль/л и 6 (3 %) среди пациентов с глюкозой более 11,1 ммоль/л; при этом 34 пациента (4%) было среди всех пациентов с глюкозой более 7,0 ммоль/л. Достоверных отличий между описанными группами выявлено не было (табл. 3).

Значение критерия χ^2 составило 2,853, критическое значение χ^2 при уровне значимости $p<0,05$ составляло 5,991. Таким образом, связь между факторным и результативным признаками статистически не значима, так как уровень значимости $p>0,05$ и составил 0,241.

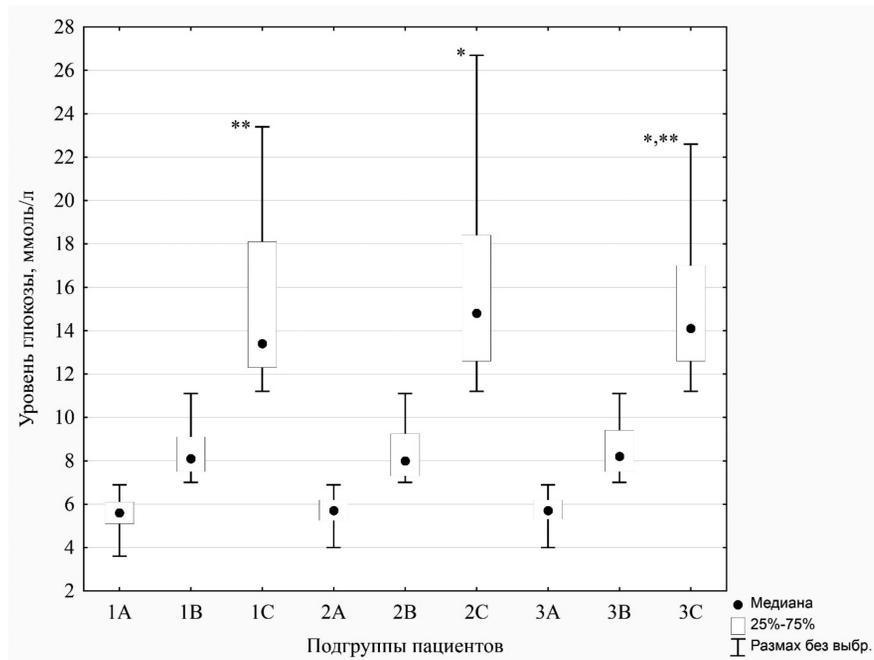
Летальные исходы. В исследование включено 103 (4%) пациента с летальными исходами с диагнозом ОКС. В том числе 44 (3%) пациента с уровнем глюкозы при поступлении менее 7,0 ммоль/л; 41 (6%) паци-

Таблица 1

Распределение пациентов с ОКС по возрасту и уровню глюкозы при первичном обследовании

Возраст, годы	Уровень глюкозы, ммоль/л					
	Подгруппа А (< 7,0)		Подгруппа В (7,0 – 11,1)		Подгруппа С (> 11,1)	
	n	М	n	М	n	М
Группа 1 (35 – 59)	435 (76%)**	5,6 (5,1; 6,1)	111 (19%)**	8,1 (7,5; 9,1)	29 (5%)**	13,4** (12,3; 18,1)
Группа 2 (60 – 74)	664 (65%)*	5,7 (5,3; 6,2)	252 (25%)*	8,0 (7,3; 9,3)	102 (10%)*	14,8* (12,6; 18,4)
Группа 3 (≥ 75)	519 (61%)* **	5,7 (5,3; 6,2)	268 (31%)* **	8,2 (7,5; 9,4)	69 (8%)*	14,1*** (12,6; 17,0)

Примечание. Здесь и в табл.2: n – количество пациентов в группе; М – медиана и значения 25% нижнего и 75% верхнего квартилей концентрации глюкозы. * – значимое отличие от группы 1 ($p<0,05$). ** – значимое отличие от группы 2 ($p<0,05$).



Распределение пациентов с ОКС по возрасту и уровню глюкозы при первичном обследовании.

Примечание. * – значимое отличие от группы 1 ($p < 0,05$); ** – значимое отличие от группы 2 ($p < 0,05$).

Таблица 2

Распределение пациентов с повышением уровня креатинина в плазме крови на более чем 44,2 мкмоль/л или на 25% в течение 48 – 72 ч после применения контрастного вещества при исходном уровне в пределах референсного диапазона

Возраст, годы	n	M, мкмоль/л
35 – 59	14 (3 %)	84,5 (75,0; 97,0)
60 – 74	34 (5 %)	86,0 (78,0; 96,0)
≥ 75	34 (10 %) *, **	86,5 (78,0; 95,0)

Таблица 3

Распределение пациентов по уровню глюкозы при первичном обследовании и функции почек после введения контрастного вещества

Уровень глюкозы, ммоль/л	Результативный признак		Количество пациентов
	С нарушением функций почек	Без нарушения функций почек	
< 7,0	49	1569	1618
От 7,0 до 11,1	28	603	631
> 11,1	6	194	200
Всего	83	2366	2449

Таблица 4

Распределение пациентов по уровню глюкозы при первичном обследовании и результатам госпитализации

Уровень глюкозы, ммоль/л	Результативный признак		Количество пациентов
	Летальный исход	Выписка	
< 7,0	44	1574	1618
От 7,0 до 11,1	41	590	631
> 11,1	18	182	200
Всего	103	2346	2449

ент с концентрацией глюкозы от 7,0 до 11,1 ммоль/л и 18 (9%) пациентов с концентрацией глюкозы более 11,1 ммоль/л (табл. 4).

Выявлено увеличение относительного количества пациентов с летальными исходами в группах с повышением уровня глюкозы при первичном обследовании.

Однако, значимое отличие выявлено только между группами пациентов с уровнем глюкозы при поступлении менее 7,0 ммоль/л и группой пациентов с уровнем глюкозы более 11,1 ммоль/л. Критерий χ^2 составил 21,315 ($p < 0,001$) при минимальном значении ожидаемого явления – 6,82.

Распределение пациентов по уровню глюкозы при первичном обследовании и наличию окончательного диагноза повторный инфаркт миокарда

Уровень глюкозы, ммоль/л	Пациенты с ОКС		Количество пациентов
	Повторный инфаркт миокарда	Другие окончательные диагнозы	
Подгруппа А < 7,0	82 (5%)	1536	1618
Подгруппа В 7,0 – 11,1	51 (8%)	580	631
Подгруппа С >11,1	24 (12%)	176	200
Всего	157	2292	2449

Повторные инфаркты миокарда. Когорта пациентов с ОКС включала в себя 157 (6%) пациентов с окончательным диагнозом: «Повторный инфаркт миокарда (ПИМ)». В том числе 82 (5%) пациента с уровнем глюкозы при поступлении менее 7,0 ммоль/л; 51 (8%) пациент с концентрацией глюкозы от 7,0 до 11,1 ммоль/л и 24 (12%) пациента с концентрацией глюкозы более 11,1 ммоль/л (табл. 5).

Выявлено достоверное отличие по количеству пациентов с ПИМ между подгруппой А с уровнем глюкозы при первичном обследовании менее 7,0 ммоль/л и подгруппами В и С с концентрацией глюкозы от 7,0 до 11,1 и более 11,1 ммоль/л соответственно ($p=0,0064$; $p=0,0001$). Однако, достоверного различия между группами В и С не выявлено ($p=0,0844$). Для всех трёх подгрупп значение критерия χ^2 составило 18.215, критическое значение χ^2 при уровне значимости $p=0.01$ составило 9.21. Таким образом, связь между факторным и результативным признаками статистически значима. Уровень значимости $p<0,001$.

Обсуждение и выводы. Количество пациентов с концентрацией глюкозы выше 11,1 ммоль/л значимо выше в группах пожилого (от 60 до 74 лет) и старческого возраста (≥ 75 лет), чем в группе пациентов среднего возраста (от 35 до 59 лет) ($p<0,05$). Достоверного различия по количеству пациентов с концентрацией глюкозы выше 11,1 ммоль/л между возрастными группами 2 и 3 не выявлено ($p=0,143$). Представленная картина по численности пациентов с патологическим уровнем глюкозы прямо коррелирует с современной заболеваемостью сахарным диабетом 1 и 2 типа в Российской Федерации [9]. Обращает на себя внимание отсутствие статистически значимого отличия в уровне глюкозы в подгруппах А и В. В свою очередь значимое отличие выявлено в подгруппе С между всеми тремя возрастными группами пациентов. Концентрация глюкозы при первичном обследовании значимо выше у пациентов пожилого и старческого возраста, чем в группе пациентов от 35 до 59 лет. Выявленные закономерности подтверждают частое наличие коморбидности у пациентов пожилого и старческого возраста, требующей индивидуального подхода к этой группе пациентов [2, 6].

С возрастом количество пациентов с нарушениями функций почек после введения контрастного вещества в обследуемой группе с ОКС существенно увеличивалось. Значимое отличие выявлено между группами среднего (35 – 59 лет) и старческого возраста (≥ 75 лет), а также, между группами пожилого (60 – 74 лет) и старческого возраста (≥ 75 лет). Пожи-

лые люди страдают от тех же типов заболеваний почек, что и молодые люди, но само старение связано с постепенным снижением предполагаемой скорости клубочковой фильтрации, что приводит к снижению функционального резерва и делает человека более уязвимым к патологическим воздействиям гипертонической болезни и других сердечно-сосудистых заболеваний, диабета и токсичности лекарств. Наложение связанных со старением заболеваний на заболевание почек, развивающиеся в пожилом возрасте, делает клиническую картину более стёртой, а постановку диагноза более сложной. У пожилых пациентов с нарушенными функциями почек следует учитывать часто отклоняющийся от нормы метаболизм лекарств, что обязывает лечащего врача обеспечивать персонифицированный подход в диагностике и лечении пациента [10].

В исследование включено 103 (4%) пациента с летальными исходами с диагнозом ОКС. Представленная частота соответствует практике стационаров в странах Европы [3]. Выявлено увеличение относительного количества пациентов с летальными исходами в группах с увеличением уровня глюкозы при первичном обследовании. Однако, значимое отличие выявлено только между группами пациентов с уровнем глюкозы при поступлении менее 7,0 ммоль/л и группой пациентов с уровнем глюкозы более 11,1 ммоль/л. Данная корреляция между количеством летальных исходов и уровнем глюкозы при первичном обследовании позволяет применять исследование уровня глюкозы в качестве дополнительного критерия в стратификации рисков и исходов у пациентов с ОКС.

Выявлено достоверное отличие по количеству пациентов с ПИМ между подгруппой А с уровнем глюкозы при первичном обследовании менее 7,0 ммоль/л и подгруппами В и С с концентрацией глюкозы от 7,0 до 11,1 и более 11,1 ммоль/л соответственно ($p=0,0064$; $p=0,0001$). Однако, достоверного различия между группами В и С не выявлено ($p=0,0844$). Таким образом, связь между факторным и результативными признаками статистически значима. Уровень значимости $p<0,001$. Представленная статистическая картина указывает на высокий риск повторных сердечно-сосудистых событий у пациентов с ОКС и патологическим уровнем глюкозы, что коррелирует с литературными данными [11].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6-11 см. REFERENCES)

5. Руда М.Я., Аверков О.В., Голицын С.П., Грацианский Н.А., Комаров А.Л., Панченко Е.П. и др. Диагностика и лечение больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST электрокардиограммы. Клинические рекомендации. *Кардиологический вестник*. 2014; 4: 3-60.

REFERENCES

1. Roffi M., Patrono C., Collet J., Mueller C., Valgimigli M., Andreotti F. et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European Heart Journal*. 2015; 37 (3): 267-315.
2. Alexander K., Newby L., Cannon C., Armstrong P., Gibler W., Rich M. et al. Acute Coronary Care in the Elderly, Part I. *Circulation*. 2007; 115 (19): 2549-69.
3. Lettino M., Andell P., Zeymer U., Widimsky P., Danchin N., Bardaji A. et al. Diabetic patients with acute coronary syndromes in contemporary European registries: characteristics and outcomes. *European Heart Journal - Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2017; 3 (4): 198-213.
4. Ibáñez B., James S., Agewall S., Antunes M., Bucciarelli-Ducci C., Bueno H. et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *European Heart Journal*. 2017; 39 (2): 119-77.
5. Ruda M.Ya., Averkov O.V., Golitsyn S.P., Gratsianskii N.A., Komarov A.L., Panchenko E.P. et al. Diagnosis and management of ST -segment elevation myocardial infarction. Clinical guidelines. *Kardiologicheskii vestnik*. 2014; 4: 3-60. (in Russian)
6. Prejean S., Din M., Reyes E., Hage F. Guidelines in review: Comparison of the 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes and the 2015 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Journal of Nuclear Cardiology*. 2017; 25 (3): 769-76.
7. El Ouazzani J., Ghalem A., El Ouazzani G., Ismaili N., El Ouafi N. Management of hyperglycemia during and in the immediate follow-up of acute coronary syndrome. *Journal of the Saudi Heart Association*. 2017; 30 (2): 113-21.
8. Puavilai G., Chanprasertyotin S., Sriphrapradaeng A. Diagnostic criteria for diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance: 1997 criteria by the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (ADA), 1998 WHO Consultation criteria, and 1985 WHO criteria. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 1999; 44 (1); 21-6.
9. Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulova O.K., Zheleznyakova A.A., Isakov M.A. Diabetes mellitus in Russian Federation: prevalence, morbidity, mortality, parameters of glycaemic control and structure of hypoglycaemic therapy according to the Federal Diabetes Register, status 2017. *Diabetes Mellitus*. 2018; 21 (3): 144-59.
10. Perkowska-Ptasinska A., Deborska-Materkowska D., Durlik M. The current management of kidney disease in the elderly. *Minerva Med*. 2018; 109 (1): 41-52.
11. Bauters C., Lemesle G., de Groote P., Lamblin N. A systematic review and meta-regression of temporal trends in the excess mortality associated with diabetes mellitus after myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*. 2016; 217: 109–21.

Поступила 10.10.19
Принята к печати 18.10.19

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Базарный В.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н., Семенцова Е.А., Нерсесян П.М., Мандра Ю.В.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНТЕГРАЛЬНЫХ ИНДЕКСОВ В ОЦЕНКЕ БУККАЛЬНОЙ ЦИТОГРАММЫ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ ПОЛОСТИ РТА

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

Цитологический анализ буккального эпителия (БЭ) позволяет выделить более 20 цитоплазматических и кариологических аномалий, отражающих цитогенетические, воспалительные, пролиферативные и другие особенности эпителиальных клеток. С целью упрощения интерпретации и повышения информативности данного исследования нами проведен сравнительный анализ различных интегральных индексов при оценке буккальной цитограммы. Обследовано 40 практически здоровых добровольцев, 35 пациентов с хроническим пародонтитом, 22 больных с хроническим гингивитом и 20 пациентов с частичной потерей зубов. Полученные данные позволили выявить увеличение степени нарушений процессов пролиферации и апоптоза, их соотношения по мере нарастания воспалительного процесса от поражений ткани десны до воспаления тканей пародонта. В оценке состояния слизистой оболочки при хроническом гингивите наибольшие изменения отмечались со стороны индекса апоптоза, при ХП – индекс цитогенетических нарушений. У данной категории пациентов индекс накопления цитогенетических нарушений не имел преимуществ перед другими, а репаративный индекс оказался менее информативным.

Ключевые слова: буккальный эпителий; цитология; пародонтит; гингивит.

Для цитирования: Базарный В.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н., Семенцова Е.А., Нерсесян П.М., Мандра Ю.В. Использование интегральных индексов в оценке буккальной цитограммы в норме и при патологии полости рта. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12): 736-739. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-736-739>
Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Maksimova A.Y., Svetlakova E.N., Sementsova E.A., Nersesyan P.M., Mandra Yu.V.

USE OF INTEGRAL INDICES IN THE ASSESSMENT OF BUCCAL CYTOLOGY IN HEALTH AND IN THE ORAL CAVITY PATHOLOGY

FSBEI HE «Ural State Medical University»; 620028, Yekaterinburg, Russia

Cytological analysis of buccal epithelium (BE) - the buccal cytogram allows to select about 20 parameters reflecting cytogenetic, inflammatory, proliferative and other disorders in epithelial cells used for biomonitoring and laboratory diagnostics. In order to simplify and increase the information content of this study, we conducted a comparative analysis of various integral indices when interpreting the buccal cytogram. 40 practically healthy volunteers, 35 patients with chronic periodontitis, 22 patients with chronic gingivitis and 20 patients with partial loss of teeth were examined. The obtained data revealed an increase in the degree of disorders of proliferation and apoptosis, their ratio as the inflammation increased from gingival tissue lesions to inflammation periodontal tissue. In assessing the condition of the mucous membranes in chronic gingivitis, the apoptosis index turned out to be more informative. In chronic periodontitis the index of cytogenetic disorders is indicative. In this category of patients, the accumulation index of cytogenetic disorders did not have any advantages over the others, and the reparative index was less informative.

Key words: buccal epithelium; cytology; periodontitis, gingivitis; partial tooth loss.

For citation: Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Maksimova A.Y., Svetlakova E.N., Sementsova E.A., Nersesyan P.M., Mandra Yu.V. Use of integral indices in the assessment of buccal cytology in health and in the oral cavity pathology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (12): 736-739. (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-736-739>

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

Information about authors:

Bazarnyi V.V. <https://orcid.org/0000-0003-0966-9571>
Polushina L.G. <https://orcid.org/0000-0002-4921-7222>
Maksimova A. Yu. <https://orcid.org/0000-0001-8412-4315>
Svetlakova E.N. <https://orcid.org/0000-0002-7592-8343>
Sementsova E.A. <https://orcid.org/0000-0002-0296-8723>
Нерсесян П.М. <https://orcid.org/0000-0003-0748-045X>
Mandra Yu.V. <https://orcid.org/0000-0002-8439-3272>

Acknowledgment. The study was supposed by a government task. State registration number AAAA-A16-116022510211-4

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

Received 10.10.2019
Accepted 15.10.2019

Буккальный (щечный) эпителий (БЭ) представляет собой удобную «тест-систему» для оценки генотоксических эффектов факторов внешней среды, нестабильности генома, о чём свидетельствует возрастающее число публикаций [1-3]. В то же время известно, что при различных патологических процессах (пародонтит, нейро-психические заболевания, сахарный диабет, опухоли и др.) отмечаются различные реактивные изменения буккальных эпителиоцитов в виде различных цитологических аномалий – как кариологических, так и цитоплазматических [4-8]. При этом число анализируемых разными авторами параметров в буккальной цитограмме может достигать пятнадцати и более, что создает определенные сложности в ее интерпретации. Поскольку для оптимизации этой работы некоторыми авторами предложен ряд интегральных расчетных индексов, то целью данной работы явился анализ эффективности их использования, в частности - при заболеваниях слизистой оболочки рта и тканей пародонта.

Материал и методы. Работа основана на результатах клинико-лабораторного обследования 137 человек в возрасте от 22 до 60 лет. Контрольная группа представлена 40 практически здоровыми добровольцами. Пациенты были подразделены на три группы – 22 человека с хроническим гингивитом (ХГ) в стадии обострения, 35 пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) тяжелой степени и 20 человек с тяжелым ХГП, в результате осложнений которого была выполнена экстракция зубов. В дальнейшем им было проведено активное комплексное лечение в соответствии с существующими стандартами и пациенты, по поводу потери зубов направлены на дентальную имплантацию. Диагноз ХГП и ХГ был установлен на основании стандартных клинико-рентгенологических критериев, принятых «Стоматологической ассоциацией России» (2013).

Для цитологического исследования материал собирали с внутренней поверхности щеки с помощью цитощетки и переносили на предметное стекло, равномерно распределяя биоматериал. Фиксацию препаратов осуществляли красителем-фиксатором эозин метиленовый синий типа Лейшмана в течение 2 мин с последующим окрашиванием раствором азур-эозина по Романовскому в течение 20 мин. При подсчете 1000 клеток оценивали следующие цитологические аномалии: клетки с микроядрами, двухъядерные клетки, клетки с протрузиями, клетки в состоянии апоптоза (конденсация хроматина, кариопикноз, кариорексис, апоптозные тельца) и перинуклеарной вакуолю; результат выражали в процентах. Затем на основании полученных данных рассчитывали индексы, приведенные ниже. Статистический анализ данных проводился с использованием пакета Microsoft Excel и программой анализа данных Gretel. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического статистического критерия Манна-Уитни.

Результаты. Количество публикаций, посвященных анализу буккальной цитограммы в норме и патологии, постоянно увеличивается. Это ведет к возрастанию различий данных о «нормальных» показателях.

Так, например, у практически здоровых лиц среднее число клеток с микроядрами по данным разных авторов колеблется от 0 до 10,7 %, двухъядерных клеток – от 0,03 до 1,2%, клеток с кариорексисом - от 0,04% до 7,1% [1-4, 9, 10]. Такая вариация средних значений у здоровых лиц в сочетании с достаточно большим количеством параметров буккальной цитограммы привела к идее использовать некоторые расчетные индексы, позволяющие дать интегральную цитологическую характеристику состояния БЭ и упростить интерпретацию ее изменений. Нами в работе были использованы следующие индексы, представленные в литературе [2, 3, 9, 10].

Цитогенетический индекс (Ic) – сумма клеток с микроядрами, протрузиями.

Пролиферативный индекс (Ip) – сумма двухъядерных клеток (в том числе – со сдвоенными ядрами).

Индекс апоптоза (Ia) – сумма клеток с конденсацией хроматина, кариорексисом, кариопикнозом, кариолизисом и апоптозными тельцами.

Индекс накопления цитогенетических нарушений (Iac): $Iac = (Ic \times Ip / Iap) \times 100$.

Репаративный индекс (RI) = (сумма клеток с кариорексисом и кариолизисом) / (сумма двухъядерных клеток и клеток с микроядрами).

Результаты расчета данных индексов у практически здоровых и пациентов с хроническим воспалительными заболеваниями полости рта (пародонтит, гингивит) представлены в таблице.

При анализе полученных данных мы исходим из того, что гингивит можно рассматривать как наиболее легкое проявление воспалительных заболеваний пародонта, а пародонтит – как более тяжелое. Пациенты с потерей зубов имели в анамнезе самые тяжелые проявления ХГП, но они были полностью санированы и в момент обследования практически здоровы. У данных пациентов, выведенных в ремиссию, наблюдается нормализация цитогенетического и пролиферативного индекса, что говорит об их реактивности, однако индекс апоптоза увеличивается существенно, это свидетельствует о длительности и тяжести заболевания.

Как следует из приведенных данных, при хроническом гингивите не выявлено существенных отклонений цитогенетического и пролиферативного. Вместе с тем, при ХГП отмечено возрастание цитогенетического индекса в 68 раз и индекса накопления цитогенетических нарушений в 18 раз. Данное явление может быть связано, во-первых, с длительностью протекания патологического процесса. Так, гингивит, как начальная форма воспаления в пародонте, как правило, протекает в период времени, исчисляемый неделями и месяцами; хронический пародонтит, напротив, характеризуется наибольшей продолжительностью и может прогрессировать годами. Можно предположить, что за больший промежуток времени происходит накопление большего количества генетических нарушений и их тиражирование.

Во-вторых, полученные различия могут быть связаны с несколько иным характером самого патологического процесса при данных воспалительных заболеваниях пародонта. В частности при гингивите

Интегральные индексы буккальной цитограммы у здоровых людей, пациентов с хроническим пародонтитом и гингивитом

Показатели	Непараметрические величины	Контрольная группа	Хронический гингивит	ХГП тяжелой степени	ХГП + частичная потеря зубов
Цитогенетический индекс	Me	0,1	0,1	6,8	0,1
	(Q)	0; 0,4	0; 0,3	0; 9,2	0; 0,2
	P		0,06	0,04	0,07
Пролиферативный индекс	Me	1,2	0,8	1,4	0,9
	(Q)	0,2; 2,2	0,6; 1,5	1,1; 1,7	0; 1,0
	P		0,05	0,06	0,04
Индекс апоптоза	Me	3,1	5,7	16,8	53,5
	(Q)	2,9; 4,6	2,9; 9,9	11,1; 22,9	29,7; 78,8
	P		0,03	0,005	0,001
Индекс накопления цитогенетических нарушений	Me	3,1	1,4	56,6	0,16
	(Q)	0; 4,3	0; 4,5	0; 66,8	0; 0,25
	P		0,04	0,05	0,07
Репаративный индекс	Me	1,3	2,5	1,5	25,7
	Q		0; 1,6	1,0; 2,1	7,9; 55,6
	P	0; 1,7	0,05	0,07	0,001

Примечание. Me – медиана; Q – 25 и 75 перцентиль.

преобладают процессы воспаления, при хроническом пародонтите воспалительный процесс сочетается с дис- и атрофией. Чем дольше протекает воспалительный процесс при пародонтите, тем более выраженными становятся дистрофические изменения в тканях.

Важно отметить, что при пародонтите пролиферативный индекс существенно не меняется, а индекс апоптоза увеличивается, что закономерно ведет к возрастанию репаративного индекса.

Обсуждение. Ранее нами были изучены иммунологические и цитологические особенности ротовой жидкости и БЭ при ХГ и ХГП [4, 11]. Установлена связь между реактивными изменениями в БЭ и иммунореактивностью при воспалительных заболеваниях пародонта. В частности, было показано, что цитологические и кариологические особенности буккальных клеток имеют однонаправленные с активностью заболевания изменения, их можно считать показателями тяжести заболевания.

Снижение активности пролиферативных процессов в сочетании с повышением уровня клеток с дегенеративно-дистрофическими изменениями ядра, в состоянии апоптоза объяснимо механизмами воспаления пародонтальных тканей [12, 13].

Кроме того, выраженные цитологические аномалии можно объяснить при тяжелой степени ХГП «накоплением» воздействий неблагоприятных факторов среды [5], сопутствующих прогрессированию заболевания. Есть данные, что 1/3 воспалительных заболеваний пародонта связана с генетическими факторами, что способствует прогрессированию болезни [14-15].

Заключение. Выявлено, что у пациентов с частичной потерей зубов в состоянии ремиссии наблюдается нормализация цитогенетического и пролиферативного индекса, а существенно увеличивающийся индекс апоптоза свидетельствует от длительности и тяжести заболевания. Таким образом, анализ интегральных индексов при цитологическом исследовании БЭ позволяет объективно оценить сдвиг динамического равновесия между пролиферативной активностью и апоптозом в сторону апоптоза. Это является патогенетическим обоснованием для поиска способов стиму-

ляции пролиферации и умеренной ингибиции апоптоза для профилактики хронического пародонтита.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке государственного задания, госрегистрация АААА-А16-116022510211-4.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1,2, 6–8, 10, 12–15 см. REFERENCES)

3. Молоканова Ю.Л. Особенности цитоморфологии буккального эпителия курящих лиц юношеского возраста. *Вестник МГОУ. Серия: Естественные науки.* 2017; 1: 21-5.
4. Базарный В.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н., Мандра Ю.В. Цитологическая характеристика буккального эпителия при хроническом генерализованном пародонтите. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018; 12: 773-7.
5. Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Самоделкин А.Г., Белов А.А., Гушин В.А. Оценка генотоксичных эффектов в буккальном эпителии при нарушениях адаптационного статуса организма. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018; 12(2): 297-301.
9. Сычева Л.П. Цитогенетический мониторинг для оценки безопасности среды обитания человека. *Гигиена и санитария.* 2012; 6: 68-72.
11. Базарный В.В., Полушина Л.Г., Максимова А.Ю., Светлакова Е.Н., Семенова Е.А. Цитологическая характеристика процессов пролиферации и апоптоза в буккальном эпителии при хроническом гингивите *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2019; 16(1): 22-6.

REFERENCES

1. Hutter H.P., Khan A.W., Lemmerer K., Wallner P., Kundi M., Moshammer H. Cytotoxic and Genotoxic Effects of Pesticide Exposure in Male Coffee Farmworkers of the Jarabacoa Region, Dominican Republic. *Int. J. Environ Res. Public Health.* 2018; 15(8).
2. Taghibakhsh M., Farhadi S., Babae A., Sheikhi M. The Effect of Hookah Use on Buccal Mucosa: Evaluation of Repair Index. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2019; 20(4):1109-12.
3. Molokanova J. P. Cytomorphological features of buccal epithelial cells in smoking youths. *Vestnik MGOU. Seriya: estestvennyye nauki.* 2017; 1: 21-5. (in Russian)
4. Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Maksimova A.Y., Svetlakova E.N., Mandra Yu.V. Cytological characteristic of the buccal cells in chronic generalized periodontite. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2018; 63 (12): 773-6. (in Russian)

5. Deryugina A.V., Ivashchenko 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)
6. Gupta J., Gupta K., Agarwal R. Comparison of different stains in exfoliated oral mucosal cell micronucleus of potentially malignant disorders of oral cavity. *J. Cancer Res Ther*. 2019; 15(3): 615-9.
7. Cuello-Almarales D.A., Almaguer-Mederos L.E., Vázquez-Mojena Y., Almaguer-Gotay D., Zayas-Feria P., Laffita-Mesa J.M., González-Zaldívar Y., Aguilera-Rodríguez R., Rodríguez-Estupiñán A., Velázquez-Pérez L. Buccal cell micronucleus frequency is significantly elevated in patients with spinocerebellar ataxia type 2. *Archives of Medical Research*. 2017; 48(3): 297-302.
8. Sahu M., Suryawanshi H., Nayak S., Kumar P. Cytomorphometric analysis of gingival epithelium and buccal mucosa cells in type 2 diabetes mellitus patients. *J. Oral Maxillofac. Pathol*. 2017; 21(2): 224-8.
9. Sycheva L.P. Cytogenetic monitoring for assessment of safety of environmental health. *Gigiena i sanitariya*. 2012; 91(6): 68-72. (in Russian)
10. Farhadi S1, Mohamadi M, Mohamadi M. Repair Index in Examination of Nuclear Changes in the Buccal Mucosa of Smokers: A Useful Method for Screening of Oral Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2017;18(11): 3087-90.
11. Bazarnyi V.V., Polushina L.G., Maksimova A.Yu., Svetlakova E.N., Sementsova E.A. Cytological characteristics of the proliferation and apoptosis processes on buccal epithelium in chronic gingivitis. *Zhurnal Ural'skoy meditsinskoy nauki*. 2019; 16(1): 22-6. (in Russian)
12. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunology*. 2014; 35(1): 3-11.
13. Silva N., Abusleme L., Bravo D., Dutzan N., Garcia-Sesnich J. Host response mechanisms in periodontal diseases. *J. Appl Oral*. 2015; 23(3): 329-55.
14. Borba T.T, Molz P., Schlickmann D.S., Santos C., Oliveira C.F., Prá D. et al. Periodontitis: Genomic instability implications and associated risk factors. *Mutat Res. Genet. Toxicol. Environ Mutagen*. 2019; 840: 20-3.
15. Zamora-Perez A.L., Ortiz-García Y.M., Lazalde-Ramos B.P., Guerrero-Velázquez C., Gómez-Meda B.C., Ramírez-Aguilar M.Á., Zúñiga-González G.M. Increased micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa and oxidative damage in saliva from patients with chronic and aggressive periodontal diseases. *J. Periodontal. Res*. 2015; 50(1): 28-36.

Поступила 10.10.19

Принята к печати 15.10.19

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Алаторцева Г.И.¹, Лухверчик Л.Н.¹, Нестеренко Л.Н.¹, Доценко В.В.¹, Амиантова И.И.¹, Михайлов М.И.^{1,2}, Кюрегян К.К.^{1,2}, Малинникова Е.Ю.^{1,2}, Нурматов З.Ш.³, Нурматов А.З.³, Ташов К.Э.⁴, Касымов О.Т.³, Зверев В.В.¹

ОЦЕНКА ДОЛИ ГЕПАТИТА Е В ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЕ ОСТРЫХ ВИРУСНЫХ ГЕПАТИТОВ В ОТДЕЛЬНЫХ РЕГИОНАХ КЫРГЫЗСТАНА

¹ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

²Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава РФ, 125993, Москва, Россия;

³НПО «Профилактическая медицина» Минздрава Кыргызской Республики, 720005, Бишкек, Кыргызстан;

⁴Ошская межобластная объединенная клиническая больница, 714000, г. Ош, Кыргызстан

Несмотря на то, что Кыргызская Республика (КР) относится к высокоэндемичным по гепатиту Е (ГЕ) регионам мира, истинные масштабы распространения этой инфекции в стране остаются мало изученными. Проведена оценка распространенности серологических маркеров инфицирования вирусом гепатита Е (ВГЕ) среди больных острым вирусным гепатитом (ОВГ) в регионах КР с ранее установленным высоким уровнем серопревалентности. Образцы сывороток крови пациентов с предварительным диагнозом гепатит, поступивших в лечебно-профилактические учреждения г. Бишкек, г. Ош и г. Джалал-Абад в период 2018-2019 гг., исследовали методом иммуноферментного анализа с применением тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» (НПО «Диагностические системы», Россия). Антитела IgG, IgM к ВГЕ выявлены в 103 из 344 образцов (29,9%) сывороток крови пациентов с клинически и лабораторно подтвержденной патологией печени. С наибольшей частотой образцы с серомаркерами острого или перенесенного ГЕ выявлялись у лиц возрастных групп до 20 и старше 40 лет. В структуре ОВГ, диагностированных у 119 пациентов, преобладали гепатиты с фекально-оральным механизмом передачи: удельный вес ГЕ составил 47,9%, гепатита А – 35,32%. У 40,4% серопозитивных по IgM-антителам к ВГЕ лиц выявлены маркеры смешанного инфицирования вирусами гепатитов А (19,3%), В (17,5%), С (3,5%). Показана высокая распространенность серомаркеров острого ГЕ в обследуемых группах больных ОВГ в межэпидемический период в регионах Кыргызстана с ранее установленным высоким уровнем серопревалентности ВГЕ. Подтверждена необходимость включения определения серологических маркеров ГЕ в алгоритм комплексной диагностики ОВГ у пациентов всех возрастных групп с патологией печени.

Ключевые слова: вирус гепатита Е; ВГЕ; сероэпидемиология; острый вирусный гепатит; IgG-антитела к ВГЕ; IgM-антитела к ВГЕ.

Для цитирования: Алаторцева Г.И., Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Малинникова Е.Ю., Нурматов З.Ш., Нурматов А.З., Ташов К.Э., Касымов О.Т., Зверев В.В. Определение доли гепатита Е в этиологической структуре острых вирусных гепатитов в отдельных регионах Кыргызстана. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12): 740-746. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-740-746>

Alatoritseva G.I.¹, Lukhverchik L.N.¹, Nesterenko L.N.¹, Dotsenko V.V.¹, Amiantova I.I.¹, Mikhailov M.I.^{1,2}, Kyuregian K.K.^{1,2}, Malinnikova E.Yu.^{1,2}, Nurmatov Z.S.³, Nurmatov A.Z.³, Tashov K.E.⁴, Kasymov O.T.³, Zverev V.V.¹

THE ESTIMATION OF THE HEPATITIS E PROPORTION IN THE ETIOLOGICAL STRUCTURE OF ACUTE VIRAL HEPATITIS IN CERTAIN REGIONS OF KYRGYZSTAN

¹Federal State Budgetary Scientific Institution «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia;

²Russian Medical Academy of Postgraduate Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 125993, Moscow, Russia;

³Scientific Production Association «Preventive Medicine» Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, 720005, Bishkek, Kyrgyz Republic;

⁴Osh Interregional Joint Clinical Hospital, 714000, Osh, Kyrgyz Republic

Despite the fact that the Kyrgyz Republic (KR) belongs to the highly endemic regions of the world for hepatitis E, the true extent of the spread of this infection in the country remains poorly understood. It was estimated the prevalence of serological markers of hepatitis E virus (HEV) infection among patients with acute viral hepatitis (AVH) from the regions of the Kyrgyz Republic with a high level of seroprevalence previously established by us. Blood sera samples of hepatitis patients who were admitted to hospitals of Kyrgyzstan in the period 2018-2019 were examined by the enzyme immunoassay method using the kits «DS-ELISA-Anti-HEV-IgG» and «DS-ELISA-ANTI-HEV-IgM» (RPC Diagnostic Systems, Russia). IgG and IgM antibodies to HEV were detected in 103 of 344 studied samples (29.9%). Most often, seropositive specimens were detected among people of age groups under 20 and over 40 years old. Hepatitis with the fecal-oral mode of transmission was dominated in the structure of AVH: the specific gravity of hepatitis E was 47.9%, hepatitis A – 35.32%. Markers of mixed infections with other hepatitis viruses have been detected in 40.4%

IgM-positive individuals. Thus, high prevalence of serological markers of HEV infection in the territory of Kyrgyzstan during the interepidemic period had been shown. The necessity of including the determination of serological markers of hepatitis E into the algorithm for the comprehensive diagnosis of AVH in patients of all age groups with liver pathology had been confirmed.

Key words: hepatitis E virus; HEV; seroepidemiology; acute viral hepatitis; anti-HEV IgG; anti-HEV IgM.

For citation: Alatorseva G.I., Lukhverchik L.N., Nesterenko L.N., Dotsenko V.V., Amiantova I.I., Mikhailov M.I., Kyuregian K.K., Malinnikova E.Yu., Nurmatov Z.S., Nurmatov A.Z., Tashov K.E., Kasymov O.T., Zverev V.V. The estimation of the hepatitis E proportion in the etiological structure of acute viral hepatitis in certain regions of of Kyrgyzstan. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019;64 (12): 740-746 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-740-746>

For correspondence: Alatorseva Galina Ivanovna, PhD in Biological sciences, Head of the laboratory for cloning of viral genomes; e-mail: alatorseva@gmail.com

Information about authors:

Alatorseva G.I., <http://orcid.org/0000-0001-9887-4061>
Lukhverchik L.N., <http://orcid.org/0000-0002-2997-8892>
Dotsenko V.V., <http://orcid.org/0000-0002-5866-944X>
Nesterenko L.N., <http://orcid.org/0000-0002-3825-3906>
Mikhailov M.I., <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>
Kyuregian K.K., <http://orcid.org/0000-0002-3599-117X>
Malinnikova E.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5501-5707>
Nurmatov Z.S., <https://orcid.org/0000-0003-3481-227X>
Nurmatov A.Z., <https://orcid.org/0000-0002-0717-4172>
Tashov K.E., <https://orcid.org/0000-0002-3059-3834>
Kasymov O.T., <https://orcid.org/0000-0002-3304-7409>
Zverev V.V. <http://orcid.org/orcid.org/0000-0002-0017-1892>

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

Acknowledgment. This work was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (unique project identifier RFMEFI61319X0091).

Received 07.11.2019
Accepted 11.11.2019

Гепатит E (ГЕ) – острое вирусное инфекционное заболевание с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, которое характеризуется преимущественно водным путём передачи, циклически вспыхивающей заболеваемости и частым развитием острой печеночной энцефалопатии у беременных [1].

Активное изучение ГЕ началось в середине 80-х годов, когда в республиках Средней Азии СССР и других регионах мира был отмечен вспыхивающий рост заболеваемости вирусными гепатитами. Отличительными признаками эпидемического процесса в эти годы были исключительно высокая эксплозивность заболеваемости, неравномерность территориального распределения случаев заболевания, выраженный сдвиг заболеваемости в сторону старших возрастных групп [2].

Вирус гепатита E (ВГЕ) распространён повсеместно и является причиной как острого спорадического гепатита, так и вспыхивающей заболеваемости. Описано 4 генотипа вируса, вызывающих заболевание у человека с различными клиническими и эпидемиологическими особенностями. ВГЕ 1 и 2 генотипов встречается исключительно в человеческой популяции, распространён в странах с жарким климатом и передаётся фекально-оральным механизмом, в основном через загрязнённую воду. ВГЕ 3 и 4 генотипов инфицируют людей и животных, встречаются повсеместно, вызывают спорадические случаи острого гепатита. ГЕ является серьёзной проблемой здравоохранения в жарких странах с низким и средним уровнем развития медицинской помощи, поскольку острая форма этого

заболевания рассматривается как наиболее частая составляющая всех случаев острого вирусного гепатита в мире. ВОЗ сообщает о 20 миллионах случаев инфицирования ВГЕ, 3 миллионах острых случаев ГЕ, 70 тыс. летальных случаев в год [3].

Несмотря на то, что ВГЕ-инфекция во многих случаях вызывает острый гепатит умеренной тяжести, нельзя преуменьшать возможность серьёзных последствий заболевания. У беременных женщин в развивающихся странах, особенно на поздних сроках беременности, часто развивается молниеносный гепатит, приводящий к высокому уровню материнской смертности, внутриутробной гибели плода, преждевременным родам, мертворождениям [4]. У людей с хроническим заболеванием печени другой этиологии острая ВГЕ-инфекция вызывает обострение имеющихся заболеваний, у пациентов с циррозом – декомпенсацию или печёночную недостаточность. ВГЕ способен вызывать хронический гепатит у пациентов с иммуносупрессией, включая реципиентов трансплантатов, ВИЧ-инфицированных, пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями, получающих химиотерапию [5]. Основная часть смертельных исходов при ГЕ приходится на больных с хронической патологией печени (до 70%) и беременных (до 40%) [6].

Источником инфекции являются больные с любой формой заболевания, в том числе безжелтушной. Период вирусемии длится около 2 нед. Чаще болеют лица мужского пола в возрасте 15-40 лет, у детей заболевание регистрируется реже [7]. Не исключена

возможность парентеральной передачи ГЕ при переливании крови от больных с бессимптомным течением в период вирусемии [8].

Территория Кыргызской Республики (КР) является гиперэндемичной по ГЕ. Истинные масштабы распространения этой инфекции в стране остаются мало изученными. В КР на базе Республиканского научно-практического центра по контролю вирусных гепатитов при НПО «Профилактическая медицина» в 2000 г. организована и внедрена система дозорного эпидемиологического надзора (ДЭН) за ОВГ. По данным ДЭН доля случаев вирусных гепатитов неизвестной этиологии суммарно в 2000-2014 гг. составила 15% и отмечалась тенденция к её росту (2012 г. – 12,9%, 2013 г. – 15,6%, 2014 г. – 17,8%). В 15,2% образцов сывороток крови больных ОВГ, обследованных с 2000 по 2008 г., не удалось определить маркёров инфицирования вирусами гепатитов А, В, D, С. По результатам серологических исследований, проведённых в различные периоды времени, доля ГЕ в этиологической структуре ОВГ в КР широко варьирует от 0,9% [9] до 32% [10, 11]. Распределение частоты обнаружения антител к ВГЕ по регионам республики неоднородно: высокий уровень серопревалентности среди пациентов с диагнозом ОВГ и среди условно здорового населения ранее показан в г. Бишкек и регионах, граничащих с Узбекистаном и Таджикистаном – Баткенской, Желал-Абадской, Ошской областях, низкий уровень – в северных регионах КР [11]. Значительную долю ГЕ в структуре ОВГ в столичном регионе можно объяснить процессами трудовой миграции, лучшим качеством клинической лабораторной диагностики, более высокой степенью охвата клиническими обследованиями больных.

Цель исследования – изучение распространённости серологических маркёров инфицирования ВГЕ среди больных гепатитом в регионах Кыргызстана с ранее установленным высоким уровнем серопревалентности [11, 12].

Материал и методы. Клинические образцы. Проанализировано 344 образца сывороток крови от лиц

различного возраста с клиническими и лабораторными признаками патологии печени и предварительным диагнозом ОВГ, госпитализированных с июля по август 2018 г., с января по март 2019 г. в лечебно-профилактические учреждения (ЛПУ) г. Ош ($n=188$), в том числе от лиц, проживающих в Ошской области, ($n=128$), в период с июля 2018 г. по март 2019 г. в ЛПУ г. Бишкека ($n=62$), г. Желал-Абад ($n=94$) КР.

Иммунохимические методы. Антитела IgG, IgM к ВГЕ в образцах сывороток крови выявляли с помощью иммуноферментных тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» (РУ № ФСР 2010/07840, РУ № ФСР 2010/07686, НПО «Диагностические системы», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Каждый образец исследовали в повторах. Для каждого положительного образца рассчитывали коэффициент позитивности (КП) по формуле: $KP_{OBR} = OP_{OBR} / OP_{KRIT}$, где OP_{OBR} – оптическая плотность образца, OP_{KRIT} – пороговое значение оптической плотности, рассчитанное в соответствии с инструкциями производителя. Образцы сывороток крови больных ОВГ исследовали на присутствие серологических маркёров гепатита А, В и С с помощью ИФА тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест», Россия: «Вектогеп А-IgM» (РУ № ФСР 2011/11653), «ВектоHBcAg-IgM» (РУ № ФСР 2008/03327), «Вектогеп В-HBs-антиген» (РУ № РЗН 2015/2887), «Бест анти-ВГС» (РУ № РЗН 2015/2352) в соответствии с инструкциями по применению.

Результаты. Распределение обследованных лиц с патологиями печени по возрасту и полу представлено в табл. 1. Среди обследованных количество детей и подростков до 19 лет составило 26,9%. Трудоспособные лица от 20 до 60 лет составили 71,3%, лица пенсионного возраста (от 61 года и старше) – 1,4%. Проведенное исследование позволило получить данные о распространении серологических маркёров инфицирования ВГЕ у больных гепатитами всех возрастных групп в регионах КР, в которых ранее показан высокий уровень серопревалентности ВГЕ: Ошской, Желал-Абадской обл., г. Бишкек (табл. 2). Соотно-

Таблица 1

Распределение обследованных лиц с предварительным диагнозом ОВГ по возрасту и полу

Возраст, годы	Количество исследованных образцов		Мужчины	Женщины	Соотношение Мужчины/Женщины
	абс.	%	абс.	абс.	
1-7	51	14,8	33	18	1:0,5
8-14	29	8,4	15	14	1:1,1
15-19	13	3,7	6	7	1:1,2
20-30	97	28,2	40	57	1:1,4
31-40	58	16,9	23	35	1:1,5
41-50	45	13,13	15	30	1:2
51-60	45	13,1	16	29	1:1,8
61 и старше	6	1,4	2	4	1:2
Итого...	344	100	150	194	1:1,27

Примечание. Здесь и в табл. 2-4: абс. – количество образцов, % – процентное отношение к исследуемой выборке.

шение мужчин и женщин повышалось с возрастом обследованных пациентов с 1:0,5 в группе детей и подростков до 1:2 в группах лиц старше 40 лет.

IgG- и IgM-антитела к ВГЕ выявлены у 103 пациентов из 344 (29,9% от общего числа обследованных) (см. табл. 2). Среди серопозитивных лиц было 23 мужчины (15,3% обследованных мужчин) и 80 женщин (43,8% обследованных женщин). У женщин специфические антитела IgM, IgG обнаруживались практически с одинаковой частотой (52 и 55%, соответственно), в 11% случаев IgM и IgG-антитела присутствовали одновременно. У мужчин IgM-антитела выявлялись достоверно чаще (65%), чем IgG-антитела (35%).

Антитела к ВГЕ выявлены практически во всех возрастных группах. В группе детей и подростков в возрасте от 1 до 19 лет наблюдалось постепенное повышение частоты обнаружения антител: 17,6% у детей от 1 до 7 лет, 27,6% – от 8 до 14 лет, 38,5% – от 15 до 19 лет. У пациентов данной группы преобладали IgM-антитела (в 100% образцов от детей до 14 лет и в 80% – от 15 до 19 лет). Случаев одновременного присутствия IgG- и IgM-антител к ВГЕ не обнаружено.

Анализ частоты встречаемости антител к ВГЕ у взрослых показал, что наибольшее количество серо-

позитивных лиц приходится на старшие возрастные группы: 41-50 лет (35,6%), 51-60 лет (51,1%), 61 лет и старше (66,7%). С возрастом обследуемых повышалась выявляемость IgG-антител (с 43% в группе от 20 до 30 лет до 78% в группе от 51 до 60 лет) и снижалась (с 62% до 26%) частота обнаружения IgM-антител.

Результаты анализа значений КП положительных по IgG- и IgM-антителам к ВГЕ сывороток крови представлены в табл. 3.

У 119 из 344 (34,6%) обследованных пациентов с клиническими и биохимическими признаками патологии печени выявлены серологические маркеры ОВГ: IgM-антитела к вирусам гепатитов А и Е, HBs-антиген, IgM-антитела к HBcore-антигену вируса гепатита В (ВГВ), суммарные антитела к вирусу гепатита С (ВГС) (табл. 4). Преобладали энтеральные вирусные гепатиты: удельный вес ГЕ составил 47,9%, гепатита А (ГА) – 35,3%. Индикаторы инфицирования ВГВ и ВГС обнаружены у 22,7% и 11,8% пациентов, соответственно. У 23 из 57 (40,4%) лиц с лабораторно подтвержденным диагнозом ГЕ выявлены маркеры других вирусных гепатитов, в том числе ГА (19,3%), гепатита В (ГВ) (17,5%), гепатита С (ГС) (3,5%).

Сравнительный анализ распределения выявленных случаев энтеральных ОВГ показал преобладание ГА у

Таблица 2

Частота обнаружения антител к ВГЕ у пациентов разных возрастных групп с патологией печени в регионах Кыргызстана

Показатель	Количество исследованных образцов	Количество серопозитивных образцов, абс.(%)			
		Всего	IgG ⁺	IgM ⁺	IgG ⁺ IgM ⁺
1. Регион проживания					
г. Бишкек	62	20(32,2%)	8(40%)	14(70%)	1(5%)
Джелал-Абадская область	94	22(23,4%)	5(9%)	18(82%)	2(9%)
г. Ош	60	21(33,3%)	17(81%)	5(24%)	1(5%)
Ошская область	128	43(33,6%)	24(56%)	21(49%)	6(14%)
2. Возраст, годы					
1-7	51	9(17,6%)	0	9(100%)	0
8-14	29	8(27,6%)	0	8(100%)	0
15-19	13	5(38,5%)	1(20%)	4(80%)	0
20-30	97	21(22,7%)	9(43%)	13(62%)	1(5%)
31-40	58	17(29,3%)	13(76%)	8(47%)	4(23%)
41-50	45	16(35,6%)	10(63%)	8(50%)	2(13%)
51-60	45	23(51,1%)	18(78%)	6(26%)	1(4%)
61 и старше	6	4(66,7%)	3(75%)	2(50%)	1(25%)
Всего...	344	103(29,9%)	54(53%)	58(56%)	9(9%)
3. Пол					
Мужчины	150	23(15,3%)	8(35%)	15(65%)	0
Женщины	194	80(43,8%)	45(56%)	42(52%)	9(11%)

Таблица 3

Значения КП по IgG- и IgM-антителам к ВГЕ в образцах сывороток крови пациентов с патологией печени

Коэффициент позитивности	Количество серопозитивных образцов, абс.(%)	
	IgG ⁺	IgM ⁺
от 1 до 2,5	3(6%)	13(22%)
от 2,51 до 5,0	19(36%)	14(24%)
более 5,1	31(58%)	31(54%)

Этиологическая структура ОВГ* в обследуемых регионах Кыргызстана, абс.(%)

Лица с диагнозом ОВГ	Всего	ГА	ГВ	ГС	ГЕ	в том числе микст-инфекции		
						ГЕ+ГА	ГЕ+ГВ	ГЕ+ГС
	119	42 (35,3%)	27 (22,7%)	14 (11,8%)	57 (47,9%)	11 (19,3%)	10 (17,5%)	2 (3,5%)
Пол:								
Мужчины	43	19 (44,2%)	11 (25,6%)	4 (9,3%)	15 (34,9%)	2	3	1
Женщины	74	23 (31,1%)	16 (21,6%)	10 (13,5%)	42 (56,7%)	9	7	1
Возраст, годы								
1-7	27	24 (88,8%)	1 (3,7%)	0	9 (33,3%)	7	0	0
8-14	19	11 (57,9%)	2 (10,5%)	0	8 (42,1%)	1	1	0
15-19	6	2 (33,3%)	1 (16,6%)	0	4 (66,7%)	1	0	0
20-30	27	3 (11,1%)	10 (37,0%)	5 (18,5%)	13 (48,1%)	1	3	0
31-40	17	1 (5,8%)	8 (47,1%)	3 (17,6%)	8 (47,0%)	0	3	0
41-50	9	0	3 (33,3%)	2 (22,2%)	8 (88,9%)	1	2	1
51-60 лет	11	1 (9%)	2 (18,2%)	4 (36,4%)	6 (54,5%)	0	1	1
61 и старше	3	0	0	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0	0	0
Регион проживания:								
г. Бишкек	21 (17,6%)	1 (4,8%)	6 (28,6%)	2 (9,5%)	14 (66,7%)		3	1
Джелал-Абадская обл.	49 (41,2%)	31 (63,3%)	6 (12,2%)	1 (2,0%)	17 (34,7%)	4	3	0
г. Ош	10 (8,4%)	0	2 (20%)	4 (40%)	5 (50%)	0	1	0
Ошская обл.	39 (32,8%)	10 (25,6%)	13 (33,3%)	7 (17,9%)	21 (53,8%)	7	4	2

Примечание. * - серологические маркеры вирусных гепатитов: ГА – IgM-антитела к ВГА, ГВ – HBs-антиген и/или IgM-антитела к HBs-антигену; ГС – суммарные антитела к ВГС, ГЕ – IgM-антитела к ВГЕ.

мужчин (42,2% против 31,1% у обследованных женщин), и неожиданно более частое обнаружение маркеров ГЕ у женщин (56,7% против 34,9% у мужчин).

Проанализировано распределение серопозитивности по ГА в возрастных группах. У обследованных детей от 1 до 7 и от 8 до 14 лет IgM-антитела выявлялись с максимальной частотой (88,8 и 57,9% соответственно), у подростков от 15 до 19 лет – в 33,3% случаев, у лиц более старших групп выявляемость данного серомаркера существенно снижалась. Противоположная картина обнаружена при анализе выявляемости серомаркеров ГВ. Так, доля больных с лабораторно подтвержденным диагнозом ГВ повышалась с возрастом обследуемых групп от 3,7% у детей младшего возраста до 47,1% в группе взрослых 31-40 лет. Серомаркеры ГС в основном встречались среди взрослых и частота их обнаружения росла с возрастом обследуемых: от 18,5% в группе 20-30 лет до 36,4% в группе 51-60 лет. Анализ этиологической структуры ОВГ в областях республики показал, что наибольшая частота обнаружения случаев ГА наблюдалась в Джелал-Абадской и Ошской областях, ГЕ и ГВ равномерно встречались на всех обследованных территориях, ГС наиболее часто – в г. Ош и Ошской области.

Маркеры микст-инфицирования ВГЕ и ВГА с частотой 64% выявлены у детей от 0 до 7 лет, ВГЕ и ВГВ – у 80% взрослых от 20 до 50 лет, все случаи микст-инфицирования ВГЕ и ВГС – у взрослых старше 40 лет. Случаи смешанного инфицирования ВГЕ и ВГА

наблюдались в Ошской и Джелал-Абадской областях, ВГЕ и ВГВ – во всех обследованных регионах, ВГЕ и ВГС – в г. Бишкек и Ошской области. У мальчика 9 лет, госпитализированного в Джелал-Абадскую областную клиническую больницу, одновременно диагностированы гепатиты А, Е, В.

Обсуждение. Лабораторная диагностика ГЕ основана на обнаружении специфических антител с помощью ИФА или детекции вирусной РНК методом ПЦР [7]. IgM-антитела появляются в начале заболевания и в типичных случаях обнаруживаются с первых недель и до 5 мес после начала клинических проявлений. IgG-антитела появляются вскоре после IgM-антител и могут персистировать в крови переболевших ГЕ в течение длительного времени. Подтверждением случая острого ГЕ считается обнаружение РНК ВГЕ в фекалиях и/или сыворотке крови, наличие IgM- и/или IgG-антител к ВГЕ в сочетании с клиническими и биохимическими проявлениями острой инфекции. Вероятный случай острого ГЕ характеризуется отсутствием РНК ВГЕ в фекалиях и/или сыворотке крови, наличием IgM- и/или IgG-антител к ВГЕ с увеличением титра IgG-антител в 4 и более раза в парных сыворотках крови, взятых с интервалом в 4-6 нед. В связи с коротким периодом вирусемии ВГЕ, диагностика ГЕ базируется на определении серологических маркеров инфицирования – специфических IgM- и/или IgG-антител. В данном исследовании в качестве показателя острого ГЕ оценивали наличие специфических IgM-антител.

Анализ этиологической структуры ОВГ в областях республики с ранее установленным высоким уровнем серопревалентности ВГЕ среди здорового населения показал, что энтеральные гепатиты ГА и ГЕ составляют 83% лабораторно подтвержденных случаев вирусного гепатита, что свидетельствует о сохранении тенденции преобладания энтеральных гепатитов в структуре ОВГ в данном регионе [12, 13]. Широкая распространенность сочетанного инфицирования ГЕ+ГВ и ГЕ+ГС среди взрослых указывает на необходимость обязательного тестирования всех больных с подозрением на ОВГ на маркеры ГЕ — специфические IgG- и IgM-антитела.

Для ГЕ характерна цикличность подъема вспышечной заболеваемости в высокоэндемичных регионах. Выявлена существенная доля (47,9%) серопозитивных по специфическим IgM-антителам пациентов среди лиц с клинически и лабораторно подтвержденным диагнозом ОВГ в межэпидемический период, что соответствует показателям, прогнозируемым для высокоэндемичных регионов, и может свидетельствовать о подъеме заболеваемости в изучаемый период времени 2018-2019 гг. Настораживает высокая частота обнаружения IgG-антител к ВГЕ: у 15,7% всех обследованных пациентов и у 53% серопозитивных лиц. Наличие IgG-антител к ВГЕ может свидетельствовать не только о ранее перенесенном заболевании, но и о недавнем инфицировании. Нельзя исключить, что в обследуемой группе больных могли присутствовать лица с печеночной патологией, связанной с последствиями перенесенного ГЕ. Не исключено, что наличие IgG-антител к ВГЕ при отсутствии специфических IgM-антител у больных с печеночными патологиями старших возрастных групп может свидетельствовать не только о ранее перенесенной инфекции, но и о хроническом течении ГЕ. Выявленная высокая частота обнаружения IgG-антител к ВГЕ подчеркивает значимость определения данного серомаркера инфицирования. Диагностическая ограниченность тестов, основанных на определении IgG-антител, указывает на необходимость совершенствования лабораторной диагностики ГЕ с включением определения сероконверсии в парных образцах сывороток и определения авидности IgG-антител как показателя давности инфицирования.

Острый ГЕ серологически подтвержден во всех обследованных возрастных группах. IgM-антитела к ВГЕ чаще выявлялись у детей 1-14 лет и подростков 15-19 лет. Частота обнаружения IgG-антител к ВГЕ возрастала с возрастом и максимальна у лиц старше 40 лет. Обнаруженная закономерность роста удельного веса серопозитивных по антителам IgG к ВГЕ лиц с возрастом обследуемых групп согласуется с данными других исследователей [14].

Результаты, полученные нами в настоящем и ранее проведенных исследованиях, отличаются от общих тенденций [11, 12]. В ряде работ приводятся сведения о преобладании среди заболевших ГЕ мужчин трудоспособного возраста. Нами показана более высокая заболеваемость ГЕ среди женщин по сравнению с мужчинами, и нехарактерная для ГЕ высокая встречаемость случаев заболевания среди детей. У детей

в возрасте до 14 лет из серомаркёров инфицирования ВГЕ обнаруживались исключительно специфические IgM-антитела. Это может быть связано со специфической формирования иммунного ответа у детей или свидетельствовать о раннем обращении за медицинской помощью.

Доля образцов, содержащих специфические IgG- и IgM-антитела с высокими значениями оптической плотности, (соответственно 58% и 54% образцов с КП более 5,1) превышает этот показатель, определённый в ранее проведенных сероэпидемиологических исследованиях среди условно здорового населения данных регионов КР (53,3% и 70% IgG- и IgM-позитивных образцов с низкими значениями оптической плотности и 23% и 10% — с высокими значениями) [11]. Этот факт может объясняться как подъёмом заболеваемости ГЕ в исследуемый период времени, так и особенностями выборки изучаемой группы больных.

Показана высокая распространенность заболевания в обследованных регионах, что согласуется с ранее полученными данными о высокой серопревалентности ВГЕ среди условно здорового населения и больных гепатитами лиц на территориях Джалал-Абадской, Ошской областей, в столице республики — г. Бишкек.

Полученные данные о доминировании ГЕ в структуре ОВГ на обследованных территориях КР свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения эпидемиологических закономерностей распространения заболевания в исследуемом гиперэндемичном регионе. В случаях ОВГ неясного происхождения, особенно с предполагаемым фекально-оральным механизмом передачи, в Кыргызстане, а также, по видимому, в других странах СНГ Центральной Азии, в качестве этиологического агента следует рассматривать ВГЕ, что указывает на необходимость обязательного включения серодиагностики ГЕ в алгоритм лабораторной диагностики ОВГ.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1481 от 15 августа 2019 г., уникальный идентификатор проекта RFMEFI61319X0091).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3 – 8, 14 см. REFERENCES)

2. Фаворов М.О., Шахильдян И.В., Яшина Т.Л., Онищенко Г.Г., Фирсова С.Н., Ералиев А.Е. Характеристика вспышки гепатита ни А, ни В с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя в Ошской области Киргизской ССР. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1990; 11: 37-44.
9. Алаторцева Г.И., Федорова О.Е., Замятина Н.А., Титаев А.В., Нестеренко Л.Н., Амиантова И.И. и др. Применение тест-системы «ВГЕ-скрин» для определения удельного веса гепатита Е в структуре вирусных гепатитов на территории Киргизии. *Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней*. Москва; ЗАО «МП Гигиена», 2006; 8: 76-9.
10. Абдикаримов С.Т., Усманова Р.К., Махмануров А.А., Касымова Р.О., Карагулова А.Ш., Ырысова М.Б. и др. Гепатит Е в Кыргызской Республике в межэпидемический период. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2013; 2(44): 3-6.
11. Лухверчик Л.Н., Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Доценко В.В. и др. Роль вируса гепатита

ИММУНОЛОГИЯ

- Е в этиологии острых вирусных гепатитов на территории Кыргызстана. *Здравоохранение Кыргызстана*. 2018; 2: 152-61.
12. Лухверчик Л.Н., Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Жукина М.В. и др. Исследование серопревалентности вируса гепатита Е и его роли в этиологии вирусных гепатитов на территории Кыргызстана. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2017; 3: 59-67.
 13. Кюрегян К.К., Михайлов М.И. *Молекулярно-биологические основы контроля вирусных гепатитов (монография)*. М.: Икар; 2013.
 1. Kamar N., Bendall R., Legrand-Abravanel F., Xia N.S., Ijaz S., Izopet J. et al. Hepatitis E. *Lancet*. 2012; 379: 2477-88.
 2. Favorov M. O., Shakhgil'dian I. V., Iashina T. L., Onishchenko G. G., Firsova S. N., Eraliev A. E. The characteristics of an outbreak of non-A, non-B hepatitis with a fecal-oral mechanism of the transmission of the causative agent in Osh Province, the Kirghiz SSR. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1990; 11: 37-44. (in Russian)
 3. WHO/IVB/10.14 *The Global Prevalence of Hepatitis E Virus Infection and Susceptibility: A Systematic Review*. December 2010: 23-4.
 4. Javed N., Ullah S.H., Hussain N., Sheikh M.A., Khan A., Ghafoor F. et al. Hepatitis E virus seroprevalence in pregnant women in Pakistan: maternal and fetal outcomes. *East Mediterr. Health J*. 2017; 23(8): 559-63.
 5. Murali A.R., Kotwal V., Chawla S. Chronic hepatitis E: A brief review. *World J. Hepatol*. 2015; 7(19): 2194-201.
 6. Khuroo M.S., Khuroo M.S. Hepatitis E: an emerging global disease – from discovery towards control and cure. *J. Viral. Hepat*. 2016; 23(2): 68-79.
 7. Kamar N., Dalton H.R., Abravanel F., Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin. Microbiol. Rev*. 2014; 27: 116-38.
 8. Gallian P., Piquet Y., Assal A., Djoudi R., Chiaroni J., Izopet J., Tiberghien P. Hepatitis E virus: blood transfusion implications. *Transfus. Clin. Biol*. 2014; 21(4-5): 173-7.
 9. Alatorseva G.I., Fedorov O.E., Zamyatina N.A., Titaev A.V., Nesterenko L.N., Amiantova I.I. et al. The application of the test-system «HEV-screen» to determine the proportion of hepatitis E in the structure of viral hepatitis in Kyrgyzstan. *Aktual'nye voprosy epidemiologii i infeksionnykh bolezney*. Moscow; 2006:76-9. (in Russian)
 10. Abdikarimov S.T., Usmanov R.K., Machmanurov A.A., Kasymov R.O., Karagulova A.Sh., Yrysova M.B. et al. Hepatitis E in the Kyrgyz Republic in interepidemic period. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2013; 2(44): 3-6. (in Russian)
 11. Likhverchik L.N., Alatorseva G.I., Nesterenko L.N., Mikhailov M.I., Kyuregyan K.K., Dotsenko V.V. et al. The role of hepatitis E virus in the acute viral hepatitis etiology in the Kyrgyzstan territory. *Zdravookhraneniye Kyrgyzstana*. 2018: 152-61.
 12. Likhverchik L.N., Alatorseva G.I., Nesterenko L.N., Mikhailov M.I., Kyuregyan K.K., Zhukina M.V. et al. Investigations of hepatitis E virus seroprevalence and its role in the acute viral hepatitis etiology on the Kyrgyzstan territory. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2017, 3: 59-67. (in Russian)
 13. Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. *Molecular Biological Basis of Viral Hepatitis Control*. Moscow: Ikar; 2013. (in Russian)
 14. Khuroo M.S., Khuroo M.S., Khuroo N.S. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure. *World J. Gastroenterol*. 2016; Aug; 22(31):7030-45.

Поступила 07.11.19

Принята к печати 11.11.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Говорунова Т.В.¹, Попыхова Э.Б.², Широков В.Ю.¹, Иванов А. Н.²

РАСТВОРИМЫЕ ФОРМЫ АДГЕЗИВНЫХ МОЛЕКУЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ В КАЧЕСТВЕ МАРКЕРОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОМ ПАРОДОНТИТЕ

¹Филиал частного учреждения образовательной организации ВО «Медицинский университет «Реавиз» в г. Саратов, 410076, Саратов, Россия;

²ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава РФ, 410012, Саратов, Россия

Важным фактором патогенеза хронического воспаления при пародонтите является эндотелиальная дисфункция (ЭД). Молекулы адгезии являются маркерами нарушения барьерной функции, адгезивных свойств и проницаемости сосудистой стенки. Исследование концентрации растворимых форм молекул адгезии перспективно в диагностике ЭД.

Цель работы - исследовать изменение концентрации растворимых форм адгезивных молекул семейства селектинов и суперсемейства иммуноглобулинов при их использовании в качестве маркеров системных проявлений ЭД в динамике лечения хронического генерализованного пародонтита (ХГП) с использованием хирургической и терапевтической схем. Обследовано 60 – пациентов с ХГП (33 женщины и 27 мужчин) и 20 – клинически здоровых доноров добровольцев (10 мужчин и 10 женщин). Состояние эндотелия оценивали по содержанию в сыворотке крови растворимых форм адгезивных молекул – sP- и sE-селектинов, межклеточных адгезивных молекул I типа (sICAM-1), сосудистых молекул клеточной адгезии I типа (VCAM-1) методом твердофазного ИФА. Краткосрочные результаты лечения свидетельствуют о большей эффективности терапевтической схемы в коррекции адгезивных свойств эндотелия по сравнению с хирургической. Консервативное лечение ХГП более эффективно корректировало содержание в крови адгезивных молекул эндотелия у женщин, чем у мужчин. Отдаленные результаты применения данной схемы характеризовались частичным сохранением положительного влияния на адгезивные свойства эндотелия, отдаленные результаты уступали краткосрочным. Хирургическая схема лечения ХГП у женщин в раннем послеоперационном периоде сопровождалась реактивными нарушениями адгезивных свойств эндотелия. Отдаленные результаты данной схемы лечения свидетельствовали о её большей эффективности. У женщин эффективность лечения ХГП в восстановлении адгезивных свойств эндотелия выше, чем у мужчин. Полученные результаты позволяют заключить, что системные проявления ЭД при ХГП характеризовались увеличением концентрации в крови растворимых форм молекул адгезии. Динамика концентрации адгезивных молекул на фоне лечения ХГП свидетельствовала о зависимости от пола пациентов эффективности влияния терапевтической и хирургической схем лечения на системные проявления ЭД.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция; хронический генерализованный пародонтит; молекулы адгезии.

Для цитирования: Говорунова Т. В., Попыхова Э. Б., Широков В. Ю., Иванов А. Н. Растворимые формы адгезивных молекул в сыворотке крови в качестве маркеров эндотелиальной дисфункции при хроническом генерализованном пародонтите. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12): 747-752. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-747-752>

Govorunova T. V.¹, Popikhova E. B.², Shirokov V. Yu.¹, Ivanov A. N.²

SOLUBLE FORMS OF ADHESIVE MOLECULES IN BLOOD SERUM AS A MARKER OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN CHRONIC GENERALIZED PARODONTITIS

¹Branch of a Private Institution of the Educational Organization of Higher Education «Medical University «Reaviz» in Saratov, Russia;

²Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, Saratov, Russia

An important factor in the pathogenesis of chronic inflammation in periodontitis is endothelial dysfunction (ED). Adhesion molecules are markers of impaired barrier function, adhesive properties and vascular permeability. The study of the concentration of soluble adhesion molecules is very promising in the diagnosis of ED.

The purpose of this research was to study changes in the concentration of soluble forms of adhesive molecules of the selectin family and the immunoglobulin superfamily when used as markers of systemic manifestations of ED in the dynamics of the treatment of chronic generalized periodontitis (CP) using surgical and therapeutic schemes. 60 patients with CP (33 women and 27 men) and 20 clinically healthy volunteers (10 men and 10 women) were examined. The state of the endothelium was assessed by the content in the serum of soluble forms of adhesive molecules — sP- and sE-selectins, intercellular adhesive molecules of type 1 (sICAM-1), vascular molecules of cell adhesion of type 1 (VCAM-1) by ELISA. The short-term results of non-surgical treatment of CP are more effective in correction of vascular wall adhesive properties disorders compared with surgical treatment. Conservative treatment of chronic hepatitis C effectively adjusted the blood content of adherent endothelium molecules in women than in men. The long-term results of applying this scheme were characterized by partial preservation of a positive effect on the adhesive properties of the endothelium, however; long-term results were inferior to short-term ones. Surgical treatment of CP in women in the early postoperative period was accompanied by reactive impairment of the adhesive properties of the endothelium. The long-term results of this treatment regimen testified to its greater effectiveness. In women, the effectiveness of treatment of CP in restoring the adhesive properties of the endothelium was higher than in men. The results obtained allow us to conclude that the systemic manifestations of ED in CP were characterized by an increase in the concentration in the blood of soluble forms of adhesion molecules. The dynamics of the concentration of adhesive molecules during the treatment of CP testified to the dependence of the sex of patients on the effectiveness of the influence of the therapeutic and surgical treatment regimens on the systemic manifestations of ED.

Key words: endothelial dysfunction; chronic generalized periodontitis; adhesion molecules.

Для корреспонденции: Говорунова Татьяна Валериевна, асс. каф. стоматологии; e-mail: sp-dantist@mail.ru

For citation: *Govorunova T. V., Popykhova E. B., Shirokov V. Yu., Ivanov A. N. Soluble forms of adhesive molecules in blood serum as a marker of endothelial dysfunction in chronic generalized periodontitis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (12): 747-752 (in Russ). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-747-752>*

For correspondence: *Govorunova Tatyana Valerievna, Assistant of the Department of Dentistry; e-mail: sp-dantist@mail.ru*

Information about authors:

Govorunova T., <https://orcid.org/0000-0002-9546-6158>

Popykhova E., <https://orcid.org/0000-0002-7662-4755>

Shirokov V., <https://orcid.org/0000-0001-9209-710X>

Ivanov A., <https://orcid.org/0000-0003-4061-5221>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 26.06.2019
Accepted 15.07.2019

Введение. ЭД является патогенетическим звеном широкого круга заболеваний. При хроническом пародонтите возникают системные проявления дисфункции эндотелия, сопровождающиеся нарушением его антиагрегантных, антикоагулянтных, фибринолитических свойств [1,2]. Ряд исследований свидетельствуют о том, что ЭД обуславливает взаимосвязь воспалительных заболеваний пародонта с сердечно-сосудистой патологией [2,3]. ХГП рассматривается как дополнительный фактор риска развития заболеваний сердечно-сосудистой системы, лидирующих среди причин инвалидности и смертности населения [4,5]. Учитывая высокую степень распространённости воспалительных заболеваний пародонта [6], среди которых лидирующие позиции занимает ХГП, наиболее часто встречается средняя степень тяжести его течения [7], возрастает актуальность исследования состояния эндотелия у данной категории пациентов.

Имеется ряд методов функциональной и лабораторной диагностики дисфункции эндотелия [8]. Биохимическая диагностика ЭД основана на определении маркеров, которые отражают нарушения различных функций сосудистой стенки – вазомоторной и ангиогенной активности, тромборезистентности [9]. Особое внимание уделяется группе маркеров, отражающих нарушение барьерной функции, адгезивных свойств, проницаемости сосудистой стенки. Данные литературы свидетельствуют о том, что нарушение адгезивных свойств эндотелиальных клеток представляет собой один из наиболее ранних этапов повреждения интимы кровеносных сосудов, что обуславливает перспективы использования маркеров, отражающих данные процессы для диагностики ЭД [10].

Изменение адгезивных свойств сосудистой стенки обеспечивается сложной системой гликопротеинов экспрессируемых на поверхности эндотелиоцитов. Адгезивные молекулы эндотелия включают в себя несколько структурных групп – кадгерин, интегрин, селектины, суперсемейство иммуноглобулинов. Изменение количества и функциональной активности этих молекул и их комплексов на поверхности эндотелиоцитов обеспечивают регуляцию проницаемости для веществ, процессы адгезии и трансмиграции лейкоцитов через стенки кровеносных сосудов [11].

Количественные изменения экспрессии адгезивных молекул на поверхности эндотелиальных клеток могут быть выявлены путём определения в крови концентрации растворимых форм этих молекул. Образование растворимых форм осуществляется под действием различных ферментов, в частности металлопротеиназ, и представляет собой один из механизмов физиологических и патогенетических изменений адгезивных свойств эндотелия, в частности при воспалении [10].

Цель работы - исследование изменения концентрации растворимых форм адгезивных молекул семейства селектинов и суперсемейства иммуноглобулинов при использовании их в качестве маркеров системных проявлений ЭД в динамике лечения ХГП с использованием хирургической и терапевтической схем.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 60 пациентов с ХГП (33 женщины и 27 мужчин) и 20 – клинически здоровых доноров добровольцев (10 мужчин и 10 женщин).

Всем пациентам с ХГП проводили исследование состояния тканей пародонта. С целью определения уровня гигиены ротовой полости выполнялся расчёт индекса гигиены по методу Ю. А. Федорова, В. В. Володкиной. Интенсивность воспаления оценивалась по папиллярно-маргинально-альвеолярному индексу (ПМА) по С. Парма и пародонтальному индексу по Russel.

Критериями включения пациентов в исследование являлись информированное согласие пациента на участие в исследовании, установленный диагноз ХГП средней степени тяжести, возраст от 25 до 40 лет.

Из исследования исключались пациенты и клинически здоровые доноры младше 25 и старше 40 лет, лица имеющие в анамнезе хронические заболевания сердечно-сосудистой, эндокринной, дыхательной систем, желудочно-кишечного тракта, печени и почек, аллергические заболевания, лица, получавшие антибактериальную и гормональную терапию в течение трёх месяцев до проведения обследования, злоупотребляющие алкоголем и курительными изделиями.

Пациенты с ХГП разделены случайным образом на две группы: основную группу и группу сравнения. Пациентам группы сравнения проведён базовый курс стандартной комплексной терапии, включавшей эти-

ологическое, патогенетическое, симптоматическое лечение. Этиотропная терапия включала профессиональную гигиену полости рта, назначение стоматологического геля «МетрогилДента» в виде аппликаций на десну в количестве 14 процедур и введения в пародонтальные карманы в количестве 7-8 процедур, 0,05% раствор хлоргексидина биглюконата в виде ротовых ванночек после чистки зубов в течение 5-7 дней. В качестве патогенетической терапии, направленной на улучшение локального кровотока, у пациентов с ХГП проводилось введение гепариновой мази в пародонтальный карман в количестве 3-5 процедур. Пациенты основной группы получали лечение, включающее три компонента: предоперационное консервативное лечение в течение 10 дней в виде аппликации на десну геля «МетрогилДента» и его введение в пародонтальные карманы, комбинацию открытого и закрытого кюретажа и последующую послеоперационную терапию в течение 10 дней, которая предусматривала аппликации на десны геля «МетрогилДента», гепариновой мази, ротовые ванночки 0,05% раствора хлоргексидина биглюконата после чистки зубов.

У клинически здоровых доноров забор крови из локтевой вены проводили однократно, у пациентов с ХГП – при первичном обращении, через 20 дней и 6 мес после начала лечения.

Адгезивные свойства эндотелия оценивали по изменению концентрации в сыворотке крови растворимых форм адгезивных молекул – P- и E-селектинов (sP- и sE-селектинов), межклеточных адгезивных молекул 1 типа (sICAM-1), сосудистых молекул клеточной адгезии 1 типа (VCAM-1) методом твёрдофазного ИФА с использованием наборов реактивов фирмы «BenderMedSystems» GmbH (Австрия). Реализация ИФА проводилась на микропланшетном фотометре StatFax 2100 (AwarenessTechnologyInc., США) в строгом соответствии с инструкциями производителей наборов реагентов.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью специализированного пакета программ Statistica 10.0.

Результаты. Обнаружено, что у пациентов с ХГП происходят выраженные нарушения экспрессии адгезивных молекул эндотелия. Это проявляется статистически значимым увеличением концентраций в сыворотке крови растворимых форм как sP- и sE-селектинов, так и молекул суперсемейства иммуноглобулинов sICAM-1 sVCAM-1. Как у здоровых доноров, у пациентов с ХГП наблюдаются половые различия концентрации растворимых форм селектинов в сыворотке крови. Концентрация sP- и sE- селектинов у мужчин с ХГП статистически значимо выше, чем у женщин. Увеличение концентрации в сыворотке крови селектинов относительно значений доноров добровольцев соответствующего пола больше выражено у мужчин. По сравнению со здоровыми донорами концентрация sP- и sE- селектинов в крови у мужчин с ХГП увеличивается в среднем на 28 и 90%, у женщин на 22 и 70% соответственно. Значимых половых различий концентрации растворимых форм молекул суперсемейства иммуноглобулинов sICAM-1 sVCAM-1 ни у здоровых доноров, ни у пациентов с

ХГП не выявлено. Вне зависимости от пола при ХГП концентрации в крови sICAM-1 и sVCAM-1 увеличиваются 15 и 25% соответственно.

При оценке краткосрочных эффектов терапевтической схемы лечения у пациентов с ХГП обнаружено частичное восстановление уровня растворимых форм адгезивных молекул эндотелия. Вне зависимости от пола у пациентов данной группы полностью нормализуется концентрация sP-селектина, концентрация sE-селектина снижается по сравнению со значениями до лечения, но не достигает уровня здоровых доноров. Половой диморфизм концентрации селектинов при этом сохраняется. Концентрация sICAM-1 полностью восстанавливается только у женщин, у мужчин остается выше значений здоровых доноров, что отражает меньшую эффективность терапевтической схемы в коррекции нарушений адгезивных свойств эндотелия. Концентрация sVCAM-1 вне зависимости от пола пациентов после курса терапевтического лечения значительно снижается по сравнению с исходным уровнем, но не достигает нормальных значений доноров. Статистически значимых различий концентраций sICAM-1 и sVCAM-1 у мужчин и женщин непосредственно после курса терапии ХГП не отмечается.

В раннем послеоперационном периоде у мужчин с ХГП основной группы концентрация sP-селектина остается на том же уровне, что и до лечения, концентрации sE-селектина, sICAM-1, sVCAM-1 снижаются, но не достигают пределов вариабельности значений здоровых доноров. При этом концентрации в крови селектинов и sICAM-1 у прооперированных мужчин с ХГП выше, чем в группе сравнения, пациенты которой получали лечение по терапевтической схеме. У женщин с ХГП основной группы в раннем послеоперационном периоде отмечаются реактивные изменения, характеризующиеся увеличением уровня в крови растворимых форм адгезивных молекул семейства селектинов, концентрация которых превышает значения у этих пациенток до лечения. Концентрация sICAM-1 и sVCAM-1 у женщин, получавших лечение с использованием хирургической схемы, в раннем послеоперационном периоде как и у мужчин основной группы снижаются.

Краткосрочные результаты лечения ХГП характеризовались большей эффективностью коррекции нарушений адгезивных свойств эндотелия при использовании терапевтической схемы, по сравнению с хирургической. При лечении ХГП наблюдался половой диморфизм динамики концентрации растворимых форм адгезивных молекул. Терапевтическая схема лечения ХГП более эффективно корректировала изменения концентрации в крови адгезивных молекул эндотелия у женщин, по сравнению с мужчинами. Хирургическая схема лечения ХГП у женщин, в раннем послеоперационном периоде сопровождалась усугублением нарушений адгезивных свойств эндотелия, чего не отмечалось у мужчин.

Отдаленные результаты применения терапевтической схемы характеризовались частичным сохранением её положительного влияния на адгезивные свойства сосудистой стенки. Это проявлялось значимым уменьшением в крови концентрации sE-селектина, sI-

САМ-1, sVCAM-1. Отдаленные результаты коррекции адгезивных свойств сосудистой стенки у пациентов при использовании терапевтической схемы лечения ХГП уступали краткосрочным. В отдалённом периоде после курса терапии ХГП у пациентов отмечалось увеличение концентрации в крови sP-селектина по сравнению с клинически здоровыми донорами. Половые различия экспрессии селектинов проявлялись более высокими концентрациями их растворимых форм у мужчин по сравнению с женщинами. У женщин в отдалённом периоде после курса терапии ХГП концентрация sICAM-1, sVCAM-1 соответствовали значениям здоровых доноров. У мужчин группы сравнения в отдалённом периоде концентрация sICAM-1 выше значений, чем у клинически здоровых добровольцев, что в сочетании с высокими уровнями селектинов позволило констатировать у них меньшую эффективность терапевтического лечения ХГП в коррекции нарушений адгезивных свойств сосудистой стенки по сравнению с женщинами.

Хирургическое лечение ХГП в отдалённом периоде вне зависимости от пола пациентов более эффективно снижало концентрацию в крови растворимых форм адгезивных молекул суперсемейства иммуноглобулинов. Изменение уровня селектинов в крови в отдалённом периоде после хирургического лечения ХГП зависели от пола пациентов. У женщин основной группы в отдалённом периоде концентрации sP- и sE- селектинов значимо ниже, чем у мужчин. При этом у женщин в отдалённом периоде после хирурги-

ческого лечения ХГП отмечалась нормальная концентрация sP-селектина в крови, у мужчин – повышенная до уровня значений до начала лечения.

В отдалённом периоде хирургическая схема лечения ХГП характеризовалась большей эффективностью коррекции повышенных концентраций растворимых форм адгезивных молекул, преимущественно суперсемейства иммуноглобулинов. Динамика концентрации в крови растворимых форм адгезивных молекул в отдалённом периоде зависела от пола пациентов, как при использовании терапевтической, так и хирургической схем лечения ХГП. В отдалённом периоде у женщин эффективность лечения ХГП в восстановлении адгезивных свойств эндотелия выше, чем у мужчин (см.таблицу).

Обсуждение. Результаты исследования, свидетельствуют о развитии у пациентов с ХГП системных нарушений адгезивных свойств сосудистой стенки, что подтверждают современные данные литературы, описывающие альтерацию эндотелиальных клеток у данной категории пациентов. Продемонстрировано, что при пародонтите в крови увеличивается количество эндотелиоцитов, циркулирующих в системном кровотоке [12]. Предложено несколько механизмов системного повреждения эндотелия при пародонтите: транзиторная бактеримия, обуславливающая прямую альтерацию сосудистой стенки пародонтопатогенными микроорганизмами, системные проявления воспалительного ответа, сопряжённые с продукцией большого количества провоспалительных цитокинов,

Концентрации растворимых форм адгезивных молекул эндотелия у клинически здоровых доноров и пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом в динамике лечения с использованием терапевтической и хирургической схем

Группы обследованных		sP-селектин, нг/мл	sE-селектин, нг/мл	sICAM-1, нг/мл	sVCAM-1, нг/мл	
Доноры добровольцы	мужчины (n=10)	121 (115;131)	41 (35;47)	341,5 (321;351)	762 (732;793)	
	женщины (n=10)	109 [#] (98;118)	33,5 [#] (28;38)	338 (307;350)	756 (652;878)	
ХГП до лечения	мужчины (n=27)	155* (145;162)	78* (68;83)	393* (367,5;409)	957* (902;1171)	
	женщины (n=33)	134 ^{#*} (120;150)	57 ^{#*} (48,5;72)	388* (367;401)	935* (856;996)	
Непосредственно после курса лечения ХГП	Терапия	мужчины (n=13)	121,5 ⁺ (105;132)	54,5 ^{#+} (54;57)	353,5 ⁺⁺ (345;356)	846 ⁺⁺ (835;859)
		женщины (n=16)	97,5 ⁺ (94;104)	37,5 ^{#+} (35;41)	349,5 ⁺ (342;357)	853 ⁺⁺ (839;888)
	Хирургия	мужчины (n=14)	155,5 ^{*^} (143;164)	65,5 ^{*^} (62;69)	366 ^{*^} (361;379)	884 ^{**} (842;897)
		женщины (n=17)	152,5 ^{*^} (143;162)	70,5 ^{*^} (65;73)	364,5 ^{*^} (354;370)	862 ^{**} (849;890)
Отдаленные результаты лечения ХГП	Терапия	мужчины (n=13)	145* (138;164)	66,5 ^{#+} (56;72)	365,5 ⁺⁺ (351;376)	834,5 ⁺ (783;956)
		женщины (n=16)	127,5 ^{#+} (121;136)	46,5 ^{#+} (41;49)	353 ⁺ (341;368)	875,5 ⁺ (801;898)
	Хирургия	мужчины (n=14)	140* (136;155)	60 ^{#+} (53;64)	336 [^] (307;355)	739 [^] (698;781)
		женщины (n=17)	116 ^{#+} (108;129)	40,5 ^{#+} (36;46)	335 [^] (325;345)	664,5 ⁺ (469;813)

Примечание. В каждом случае приведены медиана и квартили. ^{#+} - статистическая значимость различий (p<0,05) при сравнении мужчин и женщин внутри группы, а также по сравнению с группами соответствующего пола доноров добровольцев, показателями до лечения, и пациентами, получавшими лечение по терапевтической схеме, в тот же срок наблюдения.

дисметаболические нарушения, сопровождающееся активацией перекисного окисления липидов и увеличением содержания в крови факторов, индуцирующих оксидативный стресс эндотелиоцитов [13-15]. Выявленные в ходе данной работы изменения концентрации растворимых форм адгезивных молекул эндотелия соотносятся с результатами ранее проведённых исследований, описывающими взаимосвязи изменения концентрации sICAM-1, sVCAM-1, sPECAM-1 и селектинов в сыворотке с увеличением содержания в крови цитокинов провоспалительного ряда, как при изолированном ХГП, так и его сочетании с ишемической болезнью сердца [16,17]. При использовании концентрации растворимых форм адгезивных молекул в качестве маркёров дисфункции эндотелия необходимо учитывать пародонтологический статус обследуемых, в частности, наличие или отсутствие ХГП – распространённого сопутствующего заболевания, оказывающего выраженное влияние на адгезивные свойства эндотелия.

В литературе имеются достаточно противоречивые данные о половом диморфизме концентрации растворимых форм адгезивных молекул у здоровых лиц, в частности, имеются различные сведения о половых различиях уровня растворимых селектинов в крови. Некоторые работы демонстрируют, что у здоровых мужчин по сравнению с женщинами повышен уровень sP-селектина, некоторые sE-селектина [18, 19]. Нами впервые проанализированы половые различия концентраций растворимых форм адгезивных молекул при ХГП. Результаты свидетельствуют о том, что концентрация sP- и sE-селектинов в крови здоровых лиц, выраженность её увеличения у пациентов с ХГП, ниже у женщин по сравнению с мужчинами. При этом в раннем периоде после оперативного вмешательства на тканях пародонта у женщин отмечались выраженные реактивные изменения, проявляющиеся увеличением в крови sP- и sE-селектинов. В диагностическом плане данное наблюдение требует дифференцированного подхода с учётом пола пациентов при оценке ЭД с помощью данных маркёров. При планировании оперативного лечения пародонтита у женщин необходимо учитывать наличие всех сопутствующих заболеваний, сопровождающихся дисфункцией эндотелия. Ни в одной из исследуемых групп не наблюдалось значимых половых различий концентраций в крови sICAM-1, sVCAM-1, что согласуется с данными литературы [19].

Для лечения пациентов со средней степенью тяжести ХГП используются терапевтические и хирургические схемы [20]. Результаты, отражающие эффективность коррекции системных проявлений ХГП с помощью терапевтических схем неоднозначны. Выявлены положительные эффекты терапевтического лечения, проявляющиеся уменьшением выраженности его системных проявлений [21-23]. Отмечено отсутствие или сниженная эффективность терапевтического лечения ХГП в коррекции системных проявлений [24,25]. Нами проанализирована динамика концентрации в сыворотке крови растворимых форм адгезивных молекул в процессе хирургического и терапевтического лечения пациентов с ХГП. Полу-

ченные данные свидетельствуют о том, что положительный эффект терапевтического курса ХГП на уровень концентрации в сыворотке крови растворимых форм адгезивных молекул в краткосрочном периоде более выражен, чем при использовании хирургической схемы, и частично сохранялся в течение 6 мес. Отдалённые результаты свидетельствуют о том, что хирургическая схема превосходит терапевтическую в эффективности коррекции нарушений адгезивных свойств сосудистой стенки. Положительные эффекты хирургического лечения на адгезивные свойства эндотелия в отдалённом периоде, вероятно, обусловлены описанным в литературе снижением системных проявлений воспаления [26, 27].

Установлены половые особенности в динамике концентрации в крови адгезивных молекул эндотелия на фоне проводимого лечения. Терапевтическая схема лечения ХГП более эффективно корректирует изменение концентрации в крови адгезивных молекул эндотелия у женщин, по сравнению с мужчинами. Хирургическая схема лечения ХГП у женщин, в раннем послеоперационном периоде сопровождалась усугублением нарушений адгезивных свойств эндотелия, что не наблюдалось у мужчин. В отдалённом периоде при использовании терапевтической и хирургической схем лечения ХГП эффективность коррекции адгезивных свойств эндотелия выше у женщин по сравнению с мужчинами, что, вероятно, обусловлено эндотелий-протекторными эффектами эстрогенов [28]. Выявленные половые различия изменения адгезивных свойств сосудистой стенки у пациентов с ХГП обуславливают перспективы использования концентраций sP- и sE-селектинов, sICAM-1, sVCAM-1 в качестве маркёров ЭД для развития персонализированного подхода к лечению воспалительных заболеваний пародонта, что является одним из современных трендов модернизации пародонтологической помощи [29].

Заключение. Системные проявления ЭД при ХГП характеризуются увеличением концентрации в крови как sP- и sE- селектинов, так и молекул суперсемейства иммуноглобулинов sICAM-1, sVCAM-1. Уровень содержания sICAM-1 sVCAM-1 при ХГП не зависит от пола пациентов. Концентрация sP- и sE-селектинов в крови здоровых лиц, выраженность её увеличения у пациентов с ХГП, ниже у женщин, чем у мужчин. Динамика концентрации растворимых форм адгезивных молекул на фоне лечения ХГП свидетельствует о зависимости от пола пациентов эффективности влияния терапевтической и хирургической схем лечения на системные проявления дисфункции эндотелия. Выявленные половые различия изменения адгезивных свойств сосудистой стенки у пациентов с ХГП обуславливают перспективы использования концентраций sP- и sE-селектинов, sICAM-1, sVCAM-1 в качестве маркёров ЭД для развития персонализированного подхода в лечении воспалительных заболеваний пародонта.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа не имела спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 5, 7, 12, 15, 17-29
см. REFERENCES)

1. Широков В.Ю., Иванов А.Н., Данилов А.С. Половые различия изменений функций эндотелия сосудистой стенки в динамике лечения хронического генерализованного пародонтита с использованием миллиметровых волн. *Фундаментальные исследования*. 2013; 9-4: 756-9.
2. Широков В.Ю., Иванов А.Н., Данилов А.С. Роль дисфункции эндотелия сосудистой стенки в развитии нарушений микроциркуляции при воспалительных заболеваниях пародонта. *Стоматология*. 2014; 2: 67-9.
4. Грудянова А.И., Ткачева О.Н., Авраимова Т.В., Хватова Н.Т. Вопросы взаимосвязи воспалительных заболеваний пародонта и сердечно-сосудистой патологии. *Стоматология*. 2015; 94(3): 50-5.
6. Грудянов А.И., Макеева М.К., Пятигорская Н.В. Современные представления об этиологии, патогенезе и подходах к лечению эндодонто-пародонтальных поражений. *Вестник РАМН*. 2013; 8: 34-6.
8. Иванов А.Н., Гречихин А.А., Норкин И.А., Пучиньян Д.М. Методы диагностики эндотелиальной дисфункции. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2014; 13(4): 4-11.
9. Степанова Т.В., Иванов А.Н., Терешкина Н.Е., Попыхова Э.Б., Лагутина Д.Д. Маркеры эндотелиальной дисфункции: патогенетическая роль и диагностическое значение (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(1): 34-41.
10. Иванов А.Н., Норкин И.А., Пучиньян Д.М., Широков В.Ю., Жданова О.Ю. Адгезивные молекулы эндотелия сосудистой стенки. *Успехи физиологических наук*. 2014; 45(4): 34-49.
11. Иванов А.Н., Пучиньян Д.М., Норкин И.А. Барьерная функция эндотелия, механизмы ее регуляции и нарушения. *Успехи физиологических наук*. 2015; 46(2): 72-96.
13. Широков В.Ю., Иванов А.Н., Данилов А.С. Половые различия изменений функций эндотелия сосудистой стенки в динамике лечения хронического генерализованного пародонтита с использованием миллиметровых волн. *Фундаментальные исследования*. 2013; 9-4: 756-9.
14. Широков В.Ю., Иванов А.Н., Данилов А.С. Роль дисфункции эндотелия сосудистой стенки в развитии нарушений микроциркуляции при воспалительных заболеваниях пародонта. *Стоматология*. 2014; 93(2): 67-9.
16. Широков В.Ю., Жданова О.Ю., Иванов А.Н. Изменения адгезионной функции эндотелия и цитокиновый баланс у больных хроническим генерализованным пародонтитом. *Пародонтология*. 2015; 2(75): 55-9.

REFERENCES

1. Shirokov V.Yu., Ivanov A.N., Danilov A.S. Sexual differences of changes vascular endothelial function during the treatment of chronic generalized periodontitis with the use of millimeter waves. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013; 9: 756-9. (in Russian)
2. Shirokov V. Yu., Ivanov A.N., Danilov A.S., Govorunova T.V. Role of endothelion dysfunction in microcirculatory disorders by periodontal disease. *Stomatologiya*. 2014; 93(2): 67-9. (in Russian)
3. Bartova J., Schenkein H.A., Loos B.G. Inflammatory Mechanisms Linking Periodontal Diseases to Cardiovascular. *J. Clin. Periodontol*. 2013; 40: 51-69.
4. Grudyanov A.I., Tkacheva O.N., Avraamova T.V., Khvatova N.T. The relationship between inflammatory periodontal diseases and cardiovascular diseases. *Stomatologiya*. 2015; 94(3): 50-5. (in Russian)
5. Tonetti M.S. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *J. Clin. Periodontol*. 2009; 36: 125-9.
6. Grudyanov A.I., Makeeva M.K., Pyatigorskay N.V. Modern Concepts of Etiology, Pathogenesis and Treatment Approaches to Endo-Perio Lesions. *Vestnik RAMN*. 2013; 8: 34-6. (in Russian)
7. Bartova J., Sommerova P., Lyuya-Mi Y. Periodontitis as a risk factor of atherosclerosis. *J. Immunol. Res*. 2014; 2014: 636-893.
8. Ivanov A.N., Grechikhin A.A., Norkin I.A. Puchinyan D.M. Methods of endothelial dysfunction diagnosis. *Regionarnoe krovobrazhenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2014; 13(4): 4-11. (in Russian)
9. Stepanova T.V., Ivanov A.N., Tereshkina N.E., Popyhova E.B., Lagutina D.D. Markers of endothelial dysfunction: pathogenetic role and diagnostic significance. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64(1): 34-41. (in Russian)

10. Ivanov A.N., Norkin I.A., Puchinyan D.M., Shirokov V.Y., Zhdanova O.Y. Endothelial Cell Adhesion Molecules. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2014; 45(4): 34-49. (in Russian)
11. Ivanov A.N., Puchinyan D.M., Norkin I.A. Vascular Endothelial Barrier Function. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 2015; 46(2): 72-96. (in Russian)
12. Li X., Tse H.F., Yiu K.H., Li L.S., Jin L.J. Effect of periodontal treatment on circulating CD34(+) cells and peripheral vascular endothelial function: a randomized controlled trial. *Clin. Periodontol*. 2011; 38(2): 148-56.
13. Shirokov V.Y., Ivanov A.N., Danilov A.S. Sexual differences of changes vascular endothelial function during the treatment of chronic generalized periodontitis with the use of millimeter waves. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013; 9-4: 756-9. (in Russian)
14. Shirokov V.Yu., Ivanov A.N., Danilov A.S., Govorunova T.V. Role of endothelion dysfunction in microcirculatory disorders by periodontal disease. *Stomatologiya*. 2014; 93(2): 67-9. (in Russian)
15. Mendes R.T., Fernandes D. Endothelial dysfunction and periodontitis: The role of inflammatory serum biomarkers. *Dent Hypotheses*. 2016; 7: 4-11.
16. Shirokov V.Yu., Zhdanova O.Yu., Ivanov A.N. Endothelial adhesive function changes and cytokine balance in patients with chronic generalized periodontitis. *Parodontologiya*. 2015; 2(75): 55-9. (in Russian)
17. Mal S., Rabelo-Silva E.R., Polanczyk C.A., Furtado M.V., Montenegro M.M. Periodontal therapy and endothelial function in coronary artery disease: A randomized controlled trial. *Oral Dis*. 2018; 24(7): 1349-57.
18. Demerath E., Towne B., Blangero J., Siervogel R.M. The relationship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women. *Ann. Hum. Biol*. 2001; 28(6): 664-78.
19. Ponthieux A., Herbeth B., Drosch S., Haddy N., Lambert D., Visvikis S. Biological determinants of serum ICAM-1, E-selectin, P-selectin and L-selectin levels in healthy subjects: the Stanislas study. *Atherosclerosis*. 2004; 172(2): 299-308.
20. Sanz-Martín I., Cha J.K., Yoon S.W., Sanz-Sánchez I., Jung U.W. Long-term assessment to periodontal disease progression after surgical or non-surgical treatment: a systematic review. *J. Periodontal Implant Sci*. 2019; 49(2): 60-75.
21. Mallapragada S., Kasana J., Agrawal P. Effect of Non-surgical Periodontal Therapy on Serum Highly Sensitive Capsule Reactive Protein and Homocysteine Levels in Chronic Periodontitis: A Pilot Study. *Contemp Clin. Dent*. 2017; 8(2): 279-85.
22. Lalla E., Kaplan S., Yang J., Roth G.A., Papapanou P.N., Greenberg S. Effects of periodontal therapy on serum C-reactive protein, sE-selectin, and tumor necrosis factor-alpha secretion by peripheral blood-derived macrophages in diabetes. A pilot study. *J. Periodontal Res*. 2007; 42(3): 274-82.
23. Yuan T., Zhang Y., Zhou Y., Wang F. Effect of non-surgical periodontal therapy on level of serum soluble intercellular adhesion molecule-1 and glycated hemoglobin A1c in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *West China J. Stom*. 2013; 31(4): 415-9.
24. Marcaccini A.M., Meschiari C.A., Sorgi C.A., Saraiva M.C., de Souza A.M., Faccioli L.H. et al. Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. *J. Periodontol*. 2009; 80(4): 594-602.
25. Wang Y., Andrukhov O., Rausch-Fan X. Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis. *Front Physiol*. 2017; 13(8): 910.
26. Yun F., Firkova E.I., Xun H., Jun-Qi L. Effect of surgical periodontal therapy on serum levels of TNF-alpha in patients with chronic periodontitis. *Folia Med (Plovdiv)*. 2007; 49(1-2): 37-40.
27. Koppolu P., Durvasula S., Palaparthi R., Rao M., Sagar V. Estimate of CRP and TNF-alpha level before and after periodontal therapy in cardiovascular disease patients. *Pan Afr. Med. J*. 2013; 10: 15-92.
28. Pabbidi M.R., Kuppusamy M., Didion S.P., Sanapureddy P., Reed J.T., Sontakke S.P. Sex differences in the vascular function and related mechanisms: role of 17β-estradiol. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2018; 315(6): H1499-H1518.
29. Cañero C., Matarasso S. Predictive, preventive, personal used and participatory periodontology. *EPMAJ*. 2013; 4(1): 16.

Поступила 26.06.19

Принята к печати 15.07.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Караваяева Т.М., Фефелова Е.В., Максименя М.В., Путнева А.С., Федоренко Е.В., Терешков П.П.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНИТЕТА И ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У ЛИЦ С НИЗКИМ УРОВНЕМ ВИТАМИНА D

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, 672039, Чита, Россия

Ротовая жидкость является уникальной биологической средой, содержащей широкий спектр веществ, поступающих из локальных и системных источников, что делает возможным использование ее в качестве объекта для оценки патологических сдвигов в организме как на локальном, так и на системном уровнях. В сравнении с традиционным методом анализа крови, преимуществом оценки параметров ротовой жидкости является неинвазивность способа получения материала. У всех обследуемых был проведен забор ротовой жидкости с помощью специальных пластиковых контейнеров с тампоном, которые облегчают отбор материала, устраняя проникновение муцина в чистый исследуемый образец, что способствует получению более точных результатов анализа. Были определены: количество секреторного IgA, липополисахарид-связывающего белка (LBP), ТБК-активных продуктов, уровень общей антиоксидантной активности в ротовой жидкости у лиц с низким уровнем 25(OH)D до и после приема нативного раствора витамина D (Международное непатентованное название – Colecalciferol). В ротовой жидкости людей при дефиците витамина D снижаются концентрации секреторного IgA, липополисахарид-связывающего белка и уровень общей антиоксидантной активности, но повышается количество промежуточных продуктов липопероксидации. Курсовой прием нативного раствора витамина D нормализует работу иммунитета полости рта и восстанавливает баланс системы «перекисное окисление липидов-антиоксиданты».

Ключевые слова: ротовая жидкость; иммунитет; секреторный иммуноглобулин А; липополисахарид-связывающий белок; липопероксидация; витамин D.

Для цитирования: Караваяева Т.М., Фефелова Е.В., Максименя М.В., Путнева А.С., Федоренко Е.В., Терешков П.П. Определение некоторых показателей иммунитета и липопероксидации в ротовой жидкости у лиц с низким уровнем витамина D. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12): 753-757.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-753-757>

Karavaeva T.M., Fefelova E.V., Maximenya M.V., Putneva A.S., Fedorenko E.V., Tereshkov P.P.

DETERMINATION OF SOME INDICATORS OF IMMUNITY AND LIPOPEROXIDATION IN THE ORAL FLUID IN PERSONS WITH A LOW VITAMIN D LEVEL

The Chita State Medical Academy Healthcare Ministry of Russia, 672000, Chita, Russia

Oral fluid is a unique biological environment, containing a wide range of substances, coming from local and systemic sources, which makes it possible to use it as an object for assessing pathological changes in the body both at the local and systemic levels. In comparison with the traditional method of blood analysis, the advantage of evaluating the parameters of the oral fluid is the non-invasive of this method of obtaining material. All patients underwent oral fluid sampling using special plastic containers with a swab, which facilitate the selection of material, eliminating the penetration of mucin into a clean test sample, which helps to obtain more accurate analysis results. The amount of secretory IgA, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), TBA-active products, the level of total antioxidant activity in the oral fluid in individuals with a low level of 25(OH)D before and after taking the native solution of vitamin D "Aqua Trim" were determined. The concentrations of secretory immunoglobulin A, lipopolysaccharide, binding protein and the level of total antioxidant activity are reduced in the oral fluid of people with vitamin D deficiency, but the number of intermediate products of lyoperoxidation increases. The course intake of the native solution of vitamin D (International Nonproprietary Name – Colecalciferol) normalizes the functioning of the immunity of the oral cavity and restores the balance of the "lipid peroxidation-antioxidants" system.

Keywords: oral fluid; immunity; secretory immunoglobulin A; lipopolysaccharide-binding protein; lipid peroxidation; vitamin D.

For citation: Karavaeva T.M., Fefelova E.V., Maximenya M.V., Putneva A.S., Fedorenko E.V., Tereshkov P.P. Determination of some indicators of immunity and lipoperoxidation in the oral fluid in persons with a low vitamin D level. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (12): 753-757. (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-753-757>

For correspondence: Karavaeva T.M., Candidate of Medical Sciences., Senior Researcher of Laboratory of Clinical and Experimental Biochemistry and Immunology of Research Institute of Molecular Medicine, assistant professor of Department chemistry and biochemistry; e-mail: KaTany1@yandex.ru

Information about authors:

Karavaeva T.M., <https://orcid.org/0000-0002-0487-6275>
Fefelova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-0724-0352>
Maximenya M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6308-3411>
Putneva A.S., <https://orcid.org/0000-0003-3225-1333>
Fedorenko E.V., <https://orcid.org/0000-0003-0600-7708>
Tereshkov P.P. <https://orcid.org/0000-0002-8601-3499>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 25.09.2019
Accepted 30.10.2019

Для корреспонденции: Караваяева Татьяна Михайловна, ст. науч. сотр. лаб. клинической и экспериментальной биохимии и иммунологии НИИ молекулярной медицины, доц. каф. химии и биохимии; e-mail.: KaTany1@yandex.ru

Ротовая жидкость является уникальной биологической средой, содержащей широкий спектр веществ и по сравнению с традиционным методом анализа крови, определение в ней биохимических параметров имеет ряд неоспоримых преимуществ: неинвазивность получения материала для исследования, возможность взятия образца слюны самостоятельно и необходимое число раз [1-3]. Между тем работа с ротовой жидкостью осложнена наличием в ней муцина [4], однако появившиеся в последнее время системы для сбора слюны позволяют получить чистый и гигиеничный образец.

В состав ротовой жидкости входят органические и неорганические компоненты поступающих из локальных и системных источников [5,6], что делает возможным использование ее в качестве объекта для оценки патологических сдвигов, прежде всего в ротовой полости, а также в целом организме [7-9]. Причем на сегодняшний день особый интерес специалистов направлен на изучение взаимосвязи заболеваний полости рта с системными нарушениями организма.

Не вызывает сомнений то, что эффективность лечения стоматологических заболеваний будет зависеть от того, учтены ли все факторы, влияющие на развитие патологического процесса. Выявляются новые данные о механизмах развития и особенностях течения патологий пародонта и других болезней полости рта, развивающихся на фоне эндокринных нарушений, дефицитных состояний [10], в частности, при дефиците витамина D, поскольку по-новому интерпретируется его роль в биохимических процессах клеток и тканей [11-13].

Неоспоримо значение локальных защитных систем в сохранении здоровья структур полости рта [14], однако данные литературы об изменении содержания цитокинов, иммуноглобулинов, показателей неспецифической резистентности, параметров системы «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» в ротовой жидкости при дефиците витамина D в организме весьма немногочисленны [15].

Цель настоящей работы - оценить содержание некоторых показателей иммунного статуса и перекисного состояния в ротовой жидкости, собранной с помощью системы для сбора слюны, у лиц с низким уровнем 25(OH)D на фоне приема нативного раствора витамина D.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 22 относительно здоровых человека в возрасте от 20 до 22 лет. У 12 из них (контрольная группа) содержание в крови метаболита витамина D – 25(OH)D было в пределах нормы ($45,63 \pm 11,35$ нг/мл). Во 2-й группе (10 человек) уровень прегормона был ниже нормы ($21,00 \pm 9,96$ нг/мл). Лица 2-й группы принимали водный нативный раствор витамина D (Международное непатентованное название – Colecalciferol) по 14 капель (7000 МЕ/сут) в течение 4 нед с последующим переходом на поддерживающую дозу – 4 капли/сут. Общая продолжительность курса составила 8 недель. Указанная схема назначалась в соответствии с клиническими рекомендациями [16].

У всех обследуемых был проведен забор ротовой жидкости, как в начале исследования, так и через 8

недель. Ротовая жидкость собиралась с помощью специальных контейнеров. Данные контейнеры представляют собой пластиковые пробирки, внутри которых находится синтетический мягкий тампон, закрепленный в специальной вставке в их верхней части. Для того чтобы собрать ротовую жидкость, пациент помещает тампон в ротовую полость и пережевывает в течение трех минут. Затем тампон возвращается обратно в контейнер, который при необходимости хранится в холодильнике. Затем пробирку центрифугируют в течение 5 мин при 3000 об/мин, ротовая жидкость при этом оказывается в нижней части контейнера. После центрифугирования образуется чистый биологический образец для анализа в объеме около 1,5 мл. Замораживание, которое необходимо проводить перед исследованием слюны, собранной другими методами, не требуется.

В ротовой жидкости обследуемых методом ИФА определяли уровень секреторного иммуноглобулина А, липополисахарид-связывающего белка (LBP) с использованием наборов реактивов ИФА-Бест (Россия) и Cloud-Clone Corp. (США) соответственно, а также оценивали содержание промежуточных продуктов липопероксидации (ТБК-активные продукты) при помощи теста Л.И. Андреевой (1988) и уровень общей антиоксидантной активности (ОАА) по методу М.Ш. Промыслова и соавт. [17, 18]. Описательная статистика представлена медианой и межквартильным интервалом (25-го; 75-го перцентилей); для сравнения двух независимых выборочных совокупностей применялся критерий Манна-Уитни, а для сравнения зависимых совокупностей – W-критерий Уилкоксона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$ (см. таблицу).

Результаты и обсуждение. Оценивая результаты исследования ротовой жидкости, следует особо отметить, что методика сбора слюны с помощью специальных контейнеров оказалась удобной для пациента, а отсутствие муцина облегчило отбор материала для анализов, что в свою очередь, без сомнения, сделало их более точными.

Определение показателей иммунитета выявило: у лиц с дефицитом витамина D уровень секреторного IgA в ротовой жидкости был ниже, чем в контроле на 65,05% ($p < 0,001$), а концентрация липополисахарид-связывающего белка – меньше в 3,19 раза ($p < 0,001$).

Исследования показали, что содержание малонового диальдегида в ротовой жидкости у лиц с дефицитом витамина D превышало значения контроля в 2,25 раза ($p < 0,001$) на фоне снижения ОАА в 2,52 раза ($p < 0,001$).

На наш взгляд данный факт является неблагоприятным, поскольку многочисленными авторами указывается, что активация свободнорадикальных процессов и нарушение антиоксидантной защиты в клетках сопровождаются различными патологическими процессами в полости рта [19].

После курсового приема препарата Colecalciferol уровень 25(OH)D достиг значений контроля ($43,00 \pm 12,11$ нг/мл). Также наблюдалась нормализация показателей иммунитета: концентрация секреторного IgA выросла относительно исходной на 22,15% ($p < 0,001$), а LBP – на 547,06% ($p < 0,001$), причем циф-

Показатели иммунного и перекисного статуса в ротовой жидкости у лиц с низким уровнем 25(OH)D до и после приема нативного раствора витамина D (Ме (25-й; 75-й перцентиль))

Показатель	Контрольная группа (n=12)	До приема Colecalciferol (n=10)	После приема Colecalciferol (n=10)
Секреторный IgA, г/л	55,00 (50,00; 61,46)	19,22 (13,88; 32,22) <i>p</i> <0,001	67,18 (46,6; 83,44) <i>p</i> ₁ <0,001
LBP, нг/мл	88,00 (71,01; 97,46)	27,54 (16,00; 35,00) <i>p</i> <0,001	178,20 (124,15; 326,60) <i>p</i> <0,001 <i>p</i> ₁ <0,001
ТБК, мкмоль/л	0,44 (0,33; 0,45)	0,99 (0,79; 1,49) <i>p</i> <0,001	0,45 (0,40; 0,55) <i>p</i> ₁ <0,001
АОА, %	53,02 (50,11; 55,00)	21,03 (17,52; 22,82) <i>p</i> <0,001	45,86 (43,4; 55,93) <i>p</i> ₁ <0,001

Примечание. *p* – достоверность различий по сравнению с контрольной группой; *p*₁ – достоверность различий по сравнению с результатами, полученными до приема витамина D.

ры последнего превысили контрольные на 102,50% (*p*<0,001).

Курсовой прием Colecalciferol нормализовал значения ОАА, они статистически значимо не отличались от контроля и были выше исходных на 118,07% (*p*<0,001). Концентрация ТБК-активных продуктов снизилась в 2,2 раза (*p*<0,001) относительно исходных значений, что соответствовало контрольным значениям.

Полученные данные свидетельствуют о том, что дефицит витамина D сопровождается снижением активности локальных защитных систем полости рта.

Известно, что липополисахарид-связывающий белок, содержащийся в слюне, секретруется нейтрофилами и эпителиальными клетками слизистой оболочки. Этот протеин имеет N-концевой домен, который с высокой афинностью связывается с бактериальным липополисахаридом, что усиливает дальнейшее взаимодействие последнего CD14, ускоряя тем самым первый этап в процессе врожденного иммунного ответа [14, 20]. Иммуноглобулин класса А синтезируется в плазматических клетках собственной пластинки слизистой оболочки и в слюнных железах. Секреторный IgA обладает выраженной бактерицидностью, антивирусными и антиоксидантными свойствами, активирует комплемент, стимулирует фагоцитоз, играет решающую роль в реализации резистентности к инфекции [21]. В секретах организма sIgA связывается с бактериями (секреторные компоненты молекулы sIgA соединяются с углеводными структурами бактериальных клеток) и вирусами, блокируя тем самым их адсорбцию и адгезию к эпителию слизистой и препятствуя проникновению патогенов (микроорганизмов, их токсинов, пищевых и бактериальных антигенов) во внутреннюю среду организма [14, 21].

В свою очередь, ряд иммунных клеток, таких как макрофаги, моноциты, N-киллеры, Т-клетки, В-клетки, имеют рецепторы к активной форме витамина D – 1,25(OH)₂D, через которые последний оказывает свое пролиферирующее, иммуномодулирующее действие [22-24]. Кальцитриол усиливает дифференцировку моноцитов в макрофаги, индуцирует выработку IL-8, IL-1b, последний усиливает синтез антимикробных пептидов кателицидина и

b-дефензина (DEFB4) [22, 23]. Бета-дефензин обладает активностью против пародонтопатогенных штаммов, таких как *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Candida* и папилломавирус. Интерлейкин-8 является сильным хемоаттрактантом для нейтрофилов, продуцирующих LBP [25]. Таким образом, 1,25(OH)₂D поддерживает активность врожденных иммунных реакций организма против инфекций слизистых оболочек. Активная форма витамина D также стимулирует гуморальный Th2-иммунный ответ, угнетая экспрессию цитокинов Th1 и увеличивая экспрессию Th2-цитокинов, в том числе IL-4 [23], что, возможно, сказывается на секреции иммуноглобулинов, в частности, на продукции sIgA.

Кроме того, данные литературы свидетельствуют о способности 1,25(OH)₂D снижать интенсивность окислительного стресса путем ингибирования экспрессии циклооксигеназы 2 и индукции синтеза ферментов антиоксидантной защиты: каталазы и супероксиддисмутазы [26, 27].

В нашей работе назначение витамина D вызвало положительные эффекты, улучшило состояние врожденного и адаптивного иммунитета, повысило общую антиоксидантную активность в полости рта. Полученный результат указывает на целесообразность определения уровня витамина 25-OH витамина D в организме, как предиктора развития патологических процессов в ротовой полости с одной стороны, с другой – для необходимости использования препаратов данного биологически активного вещества в комплексной терапии.

Заключение. В ротовой жидкости, собранной с помощью специальных контейнеров для сбора слюны, возможно определение параметров иммунитета (секреторного иммуноглобулина А, липополисахарид-связывающего белка), а также показателей системы «ПОЛ - антиоксиданты» (ТБК-активных продуктов и общей антиоксидантной активности).

У здоровых лиц на фоне дефицита витамина D наблюдается снижение концентрации секреторного иммуноглобулина А, липополисахарид-связывающего белка и общей антиоксидантной активности с повышением количества промежуточных продуктов липопероксидации в ротовой жидкости.

Курсовой прием нативного раствора витамина D (Международное непатентованное название – Colescalciferol) нормализует работу иммунитета полости рта и восстанавливает баланс системы «ПОЛ-антиоксиданты».

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 6, 9, 11, 13, 20, 22-27 см. REFERENCES)

2. Вавилова Т. П., Янушев О.О., Островская И. Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: БИНОМ; 2014.
3. Мякишева Ю.В., Колсанов А.В., Власов М.Ю., Соколов А.В. Неинвазивная диагностика состояния обменных процессов в организме: маркеры ротовой жидкости. *Современные проблемы науки и образования*. 2017; 5: 41-58.
4. Колесов С.А., Короташвили Л.В. Протеом слюны и его диагностические возможности. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(5): 54-8.
5. Кочурова Е.В., Козлов С. В. Диагностические возможности слюны. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 1: 13-5.
7. Василиадис Р.А., Бельская Н.А., Вайнер Г.Б., Денисова С.Г., Бородулин В.Б. Клинико-диагностическая оценка ферментов ротовой жидкости у больных с пародонтитами различной степени тяжести. *Фундаментальные исследования*. 2014; 10-6: 1056-61.
8. Терехина Н.А., Горячева О.Г., Реук С.Э., Зубарев М.А. Диагностическое значение определения острофазовых белков в слюне больных инфарктом миокарда. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; 3: 3-5.
10. Фотина И.А. Информативность изменений биохимических параметров ротовой жидкости и сыворотки крови при сахарном диабете II типа. *Вестник новых медицинских технологий*. 2011; 4: 184-6.
12. Бухалко М.А., Скрипченко Н.В., Скрипченко Е.Ю., Имянитов Е.Н. Значение полиморфизма гена рецептора витамина D в патологии человека. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2017; 62(6): 23-8.
14. Карпук И.Ю. Роль белков слюны в мукозальном иммунитете. *Иммунология, аллергология, инфектология*. 2014; 4: 79-93.
15. Фирсова И.В., Мокрова Е.А., Заводовский Б.В., Македонова Ю.А. Витамин D и его роль в развитии стоматологических заболеваний (Обзорная статья). *Современные проблемы науки и образования*. 2014; 6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=15773> (дата обращения: 29.03.2019).
16. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Пигарова Е.А., Рожинская Л.Я., Беляя Ж.Е., Дзеранова Л.К., Каронова Т.Л., Ильин А.В. Дефицит витамина D у взрослых: диагностика, лечение и профилактика: клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава РФ. Москва; 2015.
17. Алексеев В.В., Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии : руководство по клинической и лабораторной диагностике. 3-е изд., перераб. и доп. Т.2. М.: GEOTAR-Медиа; 2013.
18. Промыслов М.Ш., Демчук М.Л. Модификация метода определения суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови. *Вопросы медицинской химии*. 1990; 4: 90-2.
19. Доменюк Д.А., Карслиева А.Г., Ташуева Л.В., Орфанова Ж.С., Иванчева Е.Н., Рисованный С.И. Изменение антиоксидантной системы смешанной слюны у детей на этапах ортодонтического лечения с использованием базисных материалов. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2014; 1: 79-84.
21. Ильиных Е.А., Уткина Н.П. Морфофункциональная характеристика реакций местного иммунитета слизистых оболочек глотки и полости рта. *Международный журнал экспериментального образования*. 2010; 8: 34-7.

REFERENCES

1. Chojnowska S., Baran T., Wilicska I., Siemicka P., Cabaj-Wiater I., Knas M. Human saliva as a diagnostic material. *Adv. Med. Sci.* 2018; 63(1): 185-91.
2. Vavilova T.P., Yanushev O.O., Ostrovskaya I.G. Saliva. Analytical capabilities and prospects. Moscow: BINOM; 2014. (in Russian)
3. Myakisheva Yu.V., Kolsanov A.V., Vlasov M.Yu., Sokolov A.V. Noninvasive diagnosis of status of exchange processes in the organism: routine liquid markers. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2017; 5: 41-58. (in Russian)
4. Kolesov S.A., Korkotashvili L.V. The proteome of saliva and its diagnostic possibilities. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(5): 54-8. (in Russian)
5. Kochurova E.V., Kozlov S.V. The diagnostic possibilities of saliva. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 1: 13-5. (in Russian)
6. Castagnola M., Scarano E., Passali G.C., Messana I., Cabras T., Iavarone F. et al. Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 2017; 37(2): 94-101.
7. Vasiliadis R.A., Belskaya N.A., Weiner G. B., Denisova S.G., Borodulin V.B. Clinical and diagnostic evaluation of oral fluid enzymes in patients with periodontitis of varying severity. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 10-6: 1056-61. (in Russian)
8. Terekhina N.A., Goryacheva O.G., Reuk S.E., Zubarev M.A. Diagnostic value of the determination of salivary acute-phase proteins in patients with myocardial infarction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; 3: 3-5. (in Russian)
9. Pfaffe T., Cooper-White J., Beyerlein P., Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin. Chem.* 2011; 57(5): 675-87.
10. Fotina I.A. Information capacity of changes in mouth liquid and blood serum biochemical parameters of patients with diabetes mellitus of the 2 type. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2011; 4: 184-6. (in Russian)
11. Bivona G., Agnello L., Ciaccio M. The immunological implication of the new vitamin D metabolism. *Cent. Eur. J. Immunol.* 2018;43(3): 331-4.
12. Bukhalko M.A., Skripchenko N.V., Skripchenko E.Yu., Imyanitov E.N. Significance of gene polymorphism of vitamin D receptor in human pathology. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2017; 62(6): 23-8. (in Russian)
13. Zmijewski M.A. Vitamin D and Human Health. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(1). pii: E145. doi: 10.3390/ijms20010145.
14. Karpuk I.Yu. Role of proteins of the saliva for the mucosal immunity. *Immunologiya, allergologiya i infektologiya*. 2014; 4: 79-93. (in Russian)
15. Firsova I.V., Mokrova E.A., Zavadovsky B.V., Makedonova Yu.A. Vitamin D and its role in the development of dental diseases (Review article). *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; 6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=15773> (in Russian)
16. Dedov I.I., Melnichenko G.A., Pigarova E.A., Rozhinskaya L. Ya., Belaya Zh.E., Dzeranova L.K., Karonova T.L., Ilin A.V. Vitamin D deficiency in adults: diagnosis, treatment and prevention: klinicheskie rekomendatsii Rossiyskoy assotsiatsii endokrinologov. Moscow; 2015. (in Russian)
17. Alekseev V.V., Karpishhenko A.I. [Meditsinskie laboratornye tekhnologii: rukovodstvo po klinicheskoy i laboratornoy diagnostike. 3e-izd., pererab. i dop. Tom 2.] Moscow: GEOTAR-Media; 2013. (in Russian)
18. Promyslov M. Sh., Demchuk M.L. Modification of the method for determining the total antioxidant activity of blood serum. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1990; 4: 90-2. (in Russian)
19. Domenyuk D.A., Karслиev A.G., Tashueva L.V., Orfanova G.S., Ivanchev E.N., Risovanny S.I. Change of mixed saliva antioxidant system of children at the stages of orthodontic treatment using the base materials. *Kubanskiy nauchnyi meditsinskiy vestnik*. 2014; 1: 79-84. (in Russian)

20. Hagio-Izaki K., Yasunaga M., Yamaguchi M., Kajiya H., Morita H., Yoneda M. et al. Lipopolysaccharide induces bacterial autophagy in epithelial keratinocytes of the gingival sulcus. *BMC Cell Biol.* 2018; 19(1): 18.
21. Il'inykh E.A., Utkina N.P. Morphofunctional characteristic of local immunity reactions in sludy muddy shells and Mouth fullness. *Mezhdunarodnyi zhurnal eksperimentalnogo obrazovaniya.* 2010; 8: 34-7. (in Russian)
22. Daniel D., Bikle I. Vitamin D. Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chem. Biol.* 2014; 21(3): 319–29.
23. Mak A. The Impact of Vitamin D on the Immunopathophysiology, Disease Activity, and Extra-Musculoskeletal Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(8). pii: E2355. doi: 10.3390/ijms19082355.
24. Zhou X., Zhang P., Wang Q., Xia S., Ji N., Ding Y., Wang Q. 25-Hydroxyvitamin D3 Alleviates Experimental Periodontitis via Promoting Expression of Cathelicidin in Mice with Type 2 Diabetic Mellitus. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* 2018; 64(5): 307-15.
25. Lu Y.R., Rao Y.B., Mou Y.J., Chen Y., Lou H.F., Zhang Y. et al. High concentrations of serum interleukin-6 and interleukin-8 in patients with bipolar disorder. *Medicine (Baltimore).* 2019; 98(7):e14419.
26. Sun J., Zhong W., Gu Y., Groome L. J., Wang Y. 1,25(OH)2D3 suppresses COX-2 up-regulation and thromboxane production in placental trophoblast cells in response to hypoxic stimulation. *Placenta.* 2014; 35(2): 143-5.
27. Piotrowska A., Wierzbicka J., Ślebioda T., Woźniak M., Tuckey R.C., Słominski A.T., Żmijewski M.A. Vitamin D derivatives enhance cytotoxic effects of H2O2 or cisplatin on human keratinocytes. *Steroids.* 2016; 110: 49–61.

Поступила 25.09.19
Принята к печати 30.10.19

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Годвалов А. П., Степанов М. С., Яковлев М. В., Кобзаренко Е. Е., Батог К. А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОПЛЁНКООБРАЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ НА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛАХ

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

Микроорганизмы способны формировать биоплёнки на поверхностях биотической и абиотической природы. В биотопах человека имеются оптимальные условия для реализации биоплёнкообразующей активности. В медицинской практике часто используются полимерные материалы для дренирования или протезирования, которые могут быть успешно колонизированы бактериями. В лабораторной практике формирование биоплёнок, как правило, оценивают на стекле или полистироле. Цель исследования – оценить методические особенности изучения биоплёнкообразующей активности микроорганизмов на поверхности синтетических полимерных материалов. Использованы штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* K-12, *Candida albicans* ATCC 10231, синтетические полимерные материалы – композиционный материал светового отверждения ДентЛайт-флоу (наногибридный текучий композит; Россия), стеклоиономерный цемент химического отверждения Fuji 1 (Япония), цемент для временной фиксации ортопедических конструкций TempBond NE (США), акрил, полиуретан, поливинилхлорид. Формирование биоплёнок в плоскостных планшетах для ИФА в данном исследовании считали как контроль. В случае если полимер относился к материалам холодного отверждения, использовали стерильные плоскостные планшеты, на дно которых тонким слоем заливали пластмассу. После затверждения пластмассы, в планшетах формировали биоплёнки. Во второй серии экспериментов материалы горячего отверждения, нарезанные в виде одинаковых частей размером 5×5×1 мм, помещали в лунки планшета и вновь использовали для определения биоплёнкообразования с последующей окраской. Для экстракции красителя кусочки переносили в новый планшет, чтобы исключить объём биомассы плёнки, сформировавшийся на стенках лунок планшета. Культивирование в обоих случаях осуществляли при 37° С в течение 24-48 ч. Биомассу плёнки окрашивали фуксином. Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$. Предлагаемые варианты определения биоплёнкообразующей способности являются доступными и показательными. Выявлено, что одни и те же микроорганизмы имеют индивидуальные показатели биоплёнкообразования для каждого полимерного материала. Стоматологический композит светового отверждения и поливинилхлорид проявляют наиболее выраженные антиадгезивные свойства, нежели цементы и полиуретан. До настоящего времени большая часть исследований биоплёнкообразования осуществлена с использованием стекла или полистирола, которые, как правило, не применяются для изготовления протезов, катетеров, дренажей и т. п., что затрудняет оценку истинной плёнкообразующей активности микроорганизмов. Предлагаемые методические подходы, особенно второй вариант подготовки образцов для тестирования, решают эту задачу. Предложенные подходы к тестированию биоплёнкообразующей активности на полимерах весьма просты в исполнении и общедоступны. Для адекватного исследования формирования биоплёнок будет целесообразным применение полимерных материалов непосредственно используемых в медицине, а не полистироловых планшет, материал которых встречается исключительно в лабораторной практике.

Ключевые слова: биоплёнкообразующая активность; биомасса плёнки; полимерные материалы; условно патогенные микроорганизмы.

Для цитирования: Годвалов А.П., Степанов М.С., Яковлев М.В., Кобзаренко Е.Е., Батог К.А. Определение биоплёнкообразующей активности микроорганизмов на синтетических полимерных материалах. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12): 758-761. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-758-761>

Godvalov A.P., Stepanov M.S., Yakovlev M.V., Kobzarenko E.E., Batog K.A.

DETERMINATION OF BIOFILM FORMING ACTIVITY OF MICROORGANISMS ON SYNTHETIC POLYMERIC MATERIALS

Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Russian Federation

Microorganisms are able to form biofilms on surfaces of biotic and abiotic nature. In turn, in human biotopes there are optimal conditions for the implementation of biofilm-forming activity. Moreover, in medical practice, polymeric materials are often used for drainage or prosthetics, which can also be successfully colonized by bacteria. However, in laboratory practice, the formation of biofilms is usually evaluated on glass or polystyrene. The purpose of the study is to evaluate the methodological features of studying the biofilm-forming activity of microorganisms on the surface of synthetic polymeric materials. We used strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* K-12, *Candida albicans* ATCC 10231, as well as synthetic polymeric materials — DentLight Flow light-curing composite material (nano-hybrid fluid composite; Russia), glass ionomer chemical curing Fuji 1 (Japan), cement for temporary fixation of orthopedic constructions TempBond NE (USA), acrylic, polyurethane and polyvinyl chloride. The formation of biofilms in flat-bottomed ELISA plates in this study was considered as a control group. If the polymer belonged to cold curing materials, sterile flat-bottomed tablets were used, the bottom of which was filled with a thin layer of plastic. After hardening

of the plastic, biofilms were formed in the tablets. In the second series of experiments, hot cured materials cut into equal parts $5 \times 5 \times 1$ mm in size were placed in the wells of a plate and again used to determine biofilm formation with subsequent coloring. To extract the dye, the pieces were transferred to a new plate to exclude the amount of film biomass formed on the walls of the plate wells. In both cases, cultivation was carried out at 37°C for 24-48 hours. The biomass of the film was stained with fuchsin. Statistical data processing was performed using *t*-Student criterion. For the threshold level of significance, the value $p < 0.05$ was taken. It is established that the proposed options for determining biofilm forming ability are available and indicative. It was revealed that the same microorganisms have individual biofilm formation indicators for each polymer material. The light curing dental composite and polyvinyl chloride exhibit the more pronounced antiadhesive properties than cements and polyurethane. Up to date, most of the studies of biofilm formation have been carried out using glass or polystyrene, which, as a rule, are not used for the manufacture of prostheses, catheters, drains, etc., which makes it difficult to assess the true film-forming activity of microorganisms. The proposed methodological approaches, especially the second option for preparing testing samples, solve this problem. In general, the proposed approaches to testing biofilm-forming activity on polymers are very simple to implement and generally available. For an adequate study of the biofilms formation, it will be advisable to use polymer materials, directly used in medicine, rather than polystyrene tablets, the material of which is found exclusively in laboratory practice.

Key words: *biofilm-forming activity; biomass of the film; polymeric materials; conditionally pathogenic microorganisms.*

For citation: Godovalov A.P., Stepanov M.S., Yakovlev M.V., Kobzarenko E.E., Batog K.A. Determination of biofilm forming activity of microorganisms on synthetic polymeric materials

Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (12): 758-761. (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-758-761>

For correspondence: Stepanov M.S.; e-mail: maximpractice@gmail.com

Information about authors:

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

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 17.09.2019

Accepted 21.09.2019

Введение. Предметом классической микробиологии до конца XX века являлось исследование чистых культур микроорганизмов. В конце XX века описана и начала активно изучаться особая форма существования микроорганизмов – биоплёнка. Биоплёнка позволяет бактериям выдерживать неблагоприятные условия, которые создаются при действии факторов физической, химической, биологической природы. Это обусловлено наличием слизисто-полимерного слоя, состоящего из протеогликанов, липополисахаридов, гликопротеидов, гликокаликса и капсул бактерий, вырабатывающихся сразу после адгезии к поверхности.

Не вызывает сомнений роль микробных биоплёнок в этиологии заболеваний, связанных с катетеризацией сосудов, протезированием сердечных клапанов и суставов, вызванных грамположительными кокками; инфекций полости рта [1], мочевых путей и среднего уха. Данные заболевания с трудом поддаются лечению и имеют высокую частоту рецидивов. В патогенезе таких процессов ведущая роль отводится комплексу факторов: межвидовой обмен плазмидами резистентности, снижение чувствительности бактерий к факторам иммунитета, формирование микробных эмболов, возможность биоплёнок, представленных грамотрицательными микроорганизмами, индуцировать инфекционно-токсический шок.

Кроме тканей организма человека, биоплёнки колонизируют различные медицинские устройства небиологической природы, внедряемые в организм человека [2]. Микробные сообщества могут колонизировать любую поверхность в природных, клинических, промышленных условиях. Главным условием является текучесть на границе двух средовых фаз. Адгезивные свойства биоплёнок зависят от каче-

ственного состава самой биоплёнки, поверхности, на которой происходит рост, факторов, окружающей биоплёнку среды [3,4]. Интерес представляют стоматологические пломбирочные и протезные материалы, представленные в большом разнообразии, как по химическому составу, так и по свойствам. Взаимодействие таких материалов с микрофлорой полости рта изучено относительно мало. Ротовая полость является уникальным местом для образования биоплёнок, так как постоянная выработка слюны, содержащей большое количество веществ матриксоподобной природы, обуславливает текучесть на границе двух сред. Бактерии прикрепляются к поверхности в водном окружении и начинают выделять слизистое, клейкое вещество, которое может прикреплять их к ряду материалов, таких как металлы, пластмасса, композитные материалы, большинство стоматологических цементов.

При стационарном лечении пациентов часто используют катетеры и дренажи из поливинилхлорида и полиуретана, на которых микроорганизмы успешно могут формировать биоплёнку, однако этот феномен детально не изучен.

Предложено несколько методов для изучения биоплёнокообразующей активности микроорганизмов, как в статических, так и в динамических условиях. При использовании статических условий основным синтетическим материалом, на котором производят изучение роста, жизнедеятельности и поведения биоплёнок, является полистирол. Из данного материала изготавливают планшеты для иммунологических исследований, плоскодонная форма лунок которых является удобной платформой для изучения плёнокообразования. Адгезия микроорганизмов к полистиролу

не отражает истинной активности последних [5], особенно если учитывать тот факт, что протезные материалы, дренажи, катетеры не содержат в своем составе этот полимер. Полистироловые планшеты могут быть модифицированы для увеличения их адгезивных свойств, что требуется для иммунологических исследований. В связи с этим представляется интересным изучить биоплёнообразование условно патогенными микроорганизмами непосредственно на материалах, используемых в медицинской практике, и которые могут быть потенциально колонизированы микроорганизмами.

Цель исследования – оценить методические особенности изучения биоплёнообразующей активности микроорганизмов на поверхности синтетических полимерных материалов.

Материал и методы. В работе использованы штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* K-12, *Candida albicans* ATCC 10231, синтетические полимерные материалы – композиционный материал светового отверждения ДентЛайт-флоу (наногибридный текучий композит; Россия), стеклоиномерный цемент химического отверждения Fuji I (Япония), цемент для временной фиксации ортопедических конструкций TempBond NE (США), акрил, полиуретан, поливинилхлорид. Формирование биоплёнок в плоскодонных планшетах для ИФА в данном исследовании считали контролем для сравнения с другими полимерными материалами, поскольку основная масса исследований проведена именно с использованием таких планшетов.

Для определения биоплёнообразующей активности микроорганизмов проведены две серии экспериментов. Если полимер относился к материалам холодного отверждения, использованы стерильные плоскодонные планшеты, на дно которых тонким слоем заливали пластмассу. После затвердевания пластмассы, в планшетах формировали биоплёнки, которые окрашивали по методике описанной ниже. После экстракции красителя раствор переносили в новый планшет для фотометрирования. Во второй

серии экспериментов материалы горячего отверждения, нарезанные в виде одинаковых частей размером 5×5×1 мм, помещали в лунки планшета и вновь использовали для определения биоплёнообразования с последующей окраской. Для экстракции красителя кусочки переносили в новый планшет, чтобы исключить объём биомассы плёнки, сформировавшийся на стенках лунок планшета.

Культивирование в обоих случаях осуществляли при 37°С в течение 24–48 ч. Для выявления биоплёнок использована методика [6] с некоторыми изменениями [7]. Вместо генцианвиолета использован фуксин, так как фуксин лучше фиксируется к полисахарам, которые являются одними из основных структурных компонентов биоплёночного матрикса.

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$.

Результаты. Установлено, что предлагаемые варианты определения биоплёнообразующей способности являются доступными и показательными. Выявлено, что одни и те же микроорганизмы имеют индивидуальные показатели биоплёнообразования для каждого полимерного материала (табл. 1 и 2).

Наименее выражена биоплёнообразующая активность условно патогенных микроорганизмов на композите светового отверждения (табл. 1), что может быть связано с меньшим поверхностным напряжением данного материала по сравнению с цементами. На поверхности такого материала имеется меньшее количество неровностей, так называемых ретенционных пунктов, способствующих прикреплению микроорганизмов. Наибольшая биомасса плёнки тест-штаммов установлена для цемента для временной фиксации ортопедических конструкций. Для стеклоиномерного цемента характерно образование биоплёнки преимущественно штаммами *E. coli* и *C. albicans* (табл. 1).

Показано, что *S. aureus* и *E. coli* практически не формируют биоплёнки на поливинилхлориде. Биомасса плёнки, образованной *C. albicans* на этом же материале практически не отличалась от таковой на полистироле.

Таблица 1

Биопленкообразующая активность тест-штаммов на разных стоматологических материалах

Материалы	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Стеклоиномерный цемент Fuji I (Япония)	1,14±0,001	1,13±0,001*	1,12±0,001*
Композит светового отверждения ДентЛайт флоу (Россия)	1,12±0,001	1,11±0,001	1,08±0,001
Цемент для временной фиксации ортопедических конструкций TempBond NE (США)	1,17±0,014*	1,23±0,042*	1,12±0,006*
Контроль (полистирол)	1,12±0,013	1,11±0,002	1,09±0,005

Примечание. * - $p < 0,05$ по отношению к контрольным пробам (полистирол).

Таблица 2

Биопленкообразующая активность условно патогенных микроорганизмов на полимерных материалах катетеров и дренажей

Материалы	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
Поливинилхлорид	0,79±0,010*	0,99±0,018*	1,00±0,029
Полиуретан	1,28±0,021*	1,32±0,010*	1,38±0,020*
Контроль (полистирол)	1,12±0,013	1,11±0,002	1,09±0,005

Примечание. * - $p < 0,05$ по отношению к контрольным пробам (полистирол).

Все три вида микроорганизмов формируют значительную биоплёнку на полиуретане (табл. 2).

При использовании первого варианта подготовки планшет выявлен существенный недостаток, который заключается в невозможности полировки материала, залитого на дно лунки. При подготовке образцов материала для второго способа требуется строго соблюдать размеры проб, что в противном случае может исказить результаты тестирования. Тем не менее предложенные варианты просты в исполнении и не требуют дополнительных затрат и дорогостоящего оборудования, позволяют проводить исследования на разных полимерных материалах.

Обсуждение. Микроорганизмы обладают уникальными свойствами, среди которых возможность колонизации любых поверхностей как биотической, так и абиотической природы. Следующим за адгезией этапом является формирование биоплёнки, которая представляет серьёзную угрозу для здоровья человека, поскольку способна обеспечивать микроорганизмам устойчивость к действию повреждающих факторов, обмен генетической информацией и селекцию вирулентных штаммов. Фактор адгезии микроорганизмов к абиотическим поверхностям преимущественно связан с её структурой и зависит от критического напряжения поверхности [8]. Чем больше поверхностное напряжение синтетического материала (50-60 нм/м), тем выше вероятность адгезии на нем микроорганизмов. Материалы на полимерной основе имеют поверхностное напряжение не более 30 Нм/м. Поверхностное напряжение материала зависит от его обработки. Установлены очень низкие показатели роста бактерий *in vitro* на поверхности сплавов, отполированных до зеркального блеска.

Предлагаемые в настоящем исследовании методические подходы позволяют оценить биоплёнкуобразующую активность непосредственно на материалах, внедряемых в организм человека. До настоящего времени большая часть исследований биоплёнкуобразования осуществлена с использованием стекла или полистирола, которые не применяются для изготовления протезов, катетров, дренажей и т.п., что затрудняет оценку истинной плёнкуобразующей активности микроорганизмов. Предлагаемые методические подходы, особенно второй вариант подготовки образцов для тестирования, решают эту задачу. Тестирование биоплёнкуобразующей активности условно патогенной микрофлоры на полимерных материалах непосредственно перед их использованием позволит более эффективно проводить профилактику биоплёночной инфекции.

Заключение. Степень биоплёнкуобразования микроорганизмами на поверхности полимерных материалов зависит от состава данного материала. Стоматологический композит светового отверждения и поливинилхлорид проявляют наиболее выраженные антиадгезивные свойства, нежели цементы и полиуретан.

Предложенные подходы к тестированию биоплёнкуобразующей активности на полимерах весьма просты в исполнении и общедоступны. Для адекватного исследования формирования биоплёнок будет целе-

сообразным применение полимерных материалов непосредственно используемых в медицине, а не полистироловых планшет, материал которых встречается исключительно в лабораторной практике.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (п. 6 см. REFERENCES)

1. Хавкин А.И., Ипполитов Ю.А., Алёшина Е.О., Комарова О.Н. Микробиота и болезни полости рта. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015; 6(118): 78-81.
2. Чеснокова М.Г., Чесноков В.А., Миронов А.Ю. Применение сканирующей электронной микроскопии с целью изучения биоплёнок *Candida albicans* на поверхности базисных пластмасс съёмных ортопедических конструкций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(5): 308-13.
3. Царёв В.Н., Абакаров С.И., Умарова С.Э. Динамика колонизации микробной флорой полости рта различных материалов, используемых для зубного протезирования. *Стоматология*. 2000; 1: 55-7.
4. Царёв В.Н., Степанов А.Г., Ипполитов Е.В., Подпорин М.С., Царёва Т.В. Контроль первичной адгезии микроорганизмов и формирования биоплёнок на стоматологических материалах, используемых для трансдентальной имплантации при зубосохраняющих операциях. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(9): 568-73.
5. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Гушчин М.О. Особенности межмикробных отношений в микробиоте влагалища инфертильных женщин. *Медицинский академический журнал*. 2017; 17(4): 53-4.
7. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. О способности к биопленкообразованию *Candida albicans*, колонизирующих вагинальный биотоп. *Успехи медицинской микологии*. 2017; 17(17): 136-40.
8. Allais G. Биопленка полости рта. *Новое в стоматологии*. 2005; (4): 4-14.

REFERENCES

1. Khavkin A.I., Ippolitov Yu.A., Aleshina E.O., Komarova O.N. Microbiota and diseases of an oral cavity. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2015; 6(118): 78-81. (in Russian)
2. Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A.Yu. Use of the scanning submicroscopy for the purpose of studying of biofilms of *Candida albicans* on the surface of basic plastic of removable orthopedic designs. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2019; 64(5): 308-13. (in Russian)
3. Tsaryov V.N., Abakarov S.I., Umarova S.Ye. Dynamics of colonization by microbic flora of oral cavity of various materials used for a denture. *Stomatologiya*. 2000; 1: 55-7. (in Russian)
4. Tsaryov V.N., Stepanov A.G., Ippolitov E.V., Podporin M.S., Tsaryova T.V. Control of primary adhesion of microorganisms and forming of biofilms on the dental materials used for transdental implantation at the toothpreserving operations. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63(9): 568-73. (in Russian)
5. Godovalov A.P., Karpunina T.I., Gushchin M.O. Features of intermicrobial relations in the microbiota of the vagina infertile women. *Meditinskiy akademicheskiy zhurnal*. 2017; 17(4): 53-4. (in Russian)
6. O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47: 2437.
7. Godovalov A.P., Karpunina T.I. About the ability to biofilm formation of *Candida albicans* colonizing a vaginal biotope. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*. 2017; 17(17): 136-40. (in Russian)
8. Allais G. Biofilm of oral cavity. *Novoe v stomatologii*. 2005; (4): 4-14. (in Russian)

Поступила 17.09.19

Принята к печати 21.09.19

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Черанев В.В., Логинова М.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Зорина Н.А., Минаева Н.В., Парамонов И.В.

ОПЫТ ВНЕДРЕНИЯ МЕТОДА INDEL ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ МОНИТОРИНГА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ХИМЕРИЗМА ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России», 610027, Киров, Россия

В ходе анализа данных литературы была сформирована панель олигонуклеотидов, включающая в себя праймеры и зонды к двадцати шести генетическим маркерам и к одному референсному гену. В результате оценки эффективности ПЦР в реальном времени на примере одного из маркеров (S01a) установлено оптимальное количество ДНК на реакцию (70 нг), обеспечивающее разрешающую способность методики не менее 0,1% с возможностью оценки линейного химеризма. Сформированная панель праймеров к генетическим полиморфизмам - InDel имеет высокую степень информативности для пар донор-реципиент Российской Федерации. За период с января 2018 по июнь 2019 года была проведена количественная оценка уровня линейного (CD3+, CD34+) и общего химеризма у 28 пациентов клиники института, получивших аллогенную трансплантацию ГСК. Результаты количественной оценки химеризма показаны на примере четырех пациентов.

Ключевые слова: мониторинг химеризма; ПЦР в реальном времени; генетические полиморфизмы InDel.

Для цитирования: Черанев В.В., Логинова М.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Зорина Н.А., Минаева Н.В., Парамонов И.В. Опыт внедрения метода InDel ПЦР в реальном времени для мониторинга количественного химеризма после аллогенной трансплантации костного мозга. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12): 762-768. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-762-768>

Cheranev V.V., Loginova M.A., Kutjavina S.S., Smirnova D.N., Zorina N.A., Minaeva N.V., Paramonov I.V.

EXPERIENCE INTRODUCTION OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF CHIMERISM AFTER ALLOGENIC STEM CELL TRANSPLANTATION BY REAL-TIME PCR WITH INDEL POLYMORPHISMS

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

Using data obtained from domestic and foreign sources, we formed a set of primers and fluorogenic probes for analyzing twenty-six specific sequence polymorphisms and one reference gene. In the course of evaluating the effectiveness of real-time PCR, using the example of one of the markers (S01a), we obtained the optimal amount of DNA per reaction (70 ng), providing a resolution of at least 0.1% of the method with the ability to estimate linear chimerism. Formed panel of primers for genetic polymorphisms - InDel has a high degree of informational content for donor-recipient pairs of Russia. From January 2018 to June 2019, a quantitative assessment of the level of linear (CD3 +, CD34 +) and general chimerism was carried out for 28 patients of the clinic of the Institution. Finally, we analyzed patients who received allografts and present 4 different clinical situations that illustrate the informativity level of this method.

Key words: quantitative assessment of chimerism; real-time PCR; InDel polymorphisms.

For citation: Cheranev V.V., Loginova M.A., Kutjavina S.S., Smirnova D.N., Zorina N.A., Minaeva N.V., Paramonov I.V. Experience introduction of quantitative analysis of chimerism after allogenic stem cell transplantation by real-time PCR with InDel polymorphism. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64(12): 762-768. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-762-768>

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

Information about authors:

Cheranev V.V., <http://orcid.org/0000-0001-5294-3033>
Loginova M.A., <http://orcid.org/0000-0001-7088-3986>
Kutjavina S.S., <http://orcid.org/0000-0002-2371-4044>
Smirnova D.N., <https://orcid.org/0000-0002-0090-1891>
Zorina N.A., <https://orcid.org/0000-0003-1948-209X>
Minaeva N.V., <https://orcid.org/0000-0002-8479-3217>
Paramonov I.V., <http://orcid.org/0000-0002-7205-912X>

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

Acknowledgment. The study was supported by a grant «УМНИК» (contract №14113ГУ/2019).

Received 14.08.2019
Accepted 16.09.2019

Введение. Количественная оценка уровня химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является обязательным прогностическим инструментом, необходимым для оценки эффективности трансплантации, своевременной диагностики посттрансплантационных осложнений и коррекции терапии [1, 6, 9, 10]. В настоящее время для мониторинга химеризма применяют как гематологические (скрининг антигенов эритроцитов АВ0, резус и др.), так и генетические подходы (RFLP, XY FISH, STR-ПЦР и VNTR-ПЦР с последующим электрофорезом, количественная ПЦР с праймерами к InDel и SNP маркерам). Указанные методы мониторинга химеризма характеризуются различной технической сложностью выполнения анализа, чувствительностью и воспроизводимостью [8].

Наибольшую распространенность в настоящее время получили мультиплексная ПЦР с праймерами к STR (Short Tandem Repeat) маркерам и количественная ПЦР с праймерами к InDel (Insertion/Deletion polymorphism) или SNP (Single Nucleotide Polymorphism) маркерам [2-7]. Первый метод востребован по причине наличия стандартизированной панели праймеров [7], относительно высокой чувствительности (до 1%), простоты и скорости исполнения, кроме этого, он не требует большого количества ДНК (примерно 10 нг на реакцию) [8, 10]. Второй метод характеризуется всеми преимуществами первого, но при этом имеет большую чувствительность (до 0,01%), что в сумме с детекцией химеризма в отдельных клеточных линиях позволяет более точно оценить течение посттрансплантационного периода [8, 10].

Метод определения биаллельного InDel полиморфизма основан на детекции локусов генома человека, которые имеют два взаимоисключающих аллеля. Один аллель несёт инсерцию (In) и содержит дополнительный фрагмент ДНК, встроенный в геном. Второй – имеет делецию (Del) и не содержит дополнительной последовательности. Длина дополнительного фрагмента, содержащегося в локусах, может варьировать от 1 до 10000 пар оснований [13], но в качестве мишени для проведения количественной ПЦР, как правило, используются микро InDel (от 1 до 50 пар оснований) [15]. Частота распределения и, как следствие, информативность InDel маркеров различна в каждой популяции [2, 5, 11, 12], при этом различия столь существенны, что на основе данных маркеров проводятся филогенетические исследования [14].

Широкое распространение в практике получила панель праймеров и зондов, разработанная в 2002 г. М. Alizadeh и соавт. [2], в дальнейшем она была дополнена М. Koldehoff и соавт. [3]. На данный момент во многих работах проведена оценка информативности, указанной выше InDel панели, для различных популяций [2, 5, 11, 12], однако для российской популяции данные до сих пор отсутствуют.

Цель исследования – апробировать и внедрить в клиническую практику методику мониторинга посттрансплантационного химеризма методом InDel ПЦР в реальном времени.

Материал и методы. Биологический материал (периферическая кровь и костный мозг) для исследова-

ния был получен от 31 пары реципиент/донор клиники ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. 28 пациентам была проведена аллогенная ТГСК (для трех пациентов она не состоялась по разным причинам).

Сортировку клеточных линий (CD34⁺; CD3⁺) проводили с использованием магнитных частиц, конъюгированных с антителами к соответствующим маркерам (Thermo Fisher Scientific, США). Препараты ДНК для оценки уровня химеризма были получены методом колоночной фильтрации с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAgen, Германия), концентрацию и показатель чистоты ДНК, которых оценивали на спектрофотометре (Infinite 200 PRO, TECAN).

Панель праймеров и зондов для проведения InDel ПЦР в реальном времени была сформирована на основании данных литературы [2-4]. Один праймер из пары был специфичен для аллеля, другой, как и зонд, отжигается на консервативном участке ДНК.

Классическую ПЦР для поиска информативных маркеров проводили в термоциклере Verity (Thermo Fisher Scientific, США), согласно температурному профилю программы амплификации (1 цикл – 5 мин при 95°C, 35 циклов – 15 с при 95°C, затем 45 с при 60°C). Каждая реакция содержала 1 мкл геномной ДНК, 5 мкл 2,5X-реакционной смеси (нуклеотиды, буфер, ROX, Mg²⁺, HS-полимераза), 300 нМ каждого праймера. Детекцию результатов осуществляли с использованием метода электрофореза в 2% агарозном геле.

При проведении количественной ПЦР в режиме реального времени в качестве флуоресцентной метки зонда использовали 5'-FAM, в качестве гасителя флуоресценции зонда – 3'-RTQ. Каждая реакция содержала 70 нг геномной ДНК, 10 мкл 2,5X-реакционной смеси (нуклеотиды, буфер, ROX, Mg²⁺, HS-полимераза), 300 нМ каждого праймера для амплификации и 200 нМ специфичного зонда. Амплификацию и детекцию сигнала проводили на приборе ДТ-96 (ДНК-Технология, Россия), согласно температурному профилю: 1 цикл – 5 мин при 95°C, 40 циклов – 15 с при 95°C, затем 45 с при 60°C.

Эффективность ПЦР оценивали при помощи метода, описанного в работе М. Alizadeh и соавт. [2]. Для этого готовили 14 последовательных разведений (от 1:0 до 1:8000) ДНК пациента в ДНК донора, которые были использованы в качестве матрицы для 15 реакций (последняя выступала в качестве негативного контроля и содержала только ДНК донора). Для получения точного значения эффективности ПЦР по результатам реакции строилась прямая зависимости порогового цикла (C_t) от логарифма относительного количества ДНК пациента в реакции (рис. 1). Для подсчета эффективности использовали формулу:

$$E=10^{-1/s} - 1,$$

где s – коэффициент угла наклона прямой.

Наличие информативного маркера подтверждали проведением ПЦР в реальном времени: маркер считали информативным, если его C_t был в пределах от 21 до 25. В случаях, когда C_t маркера было равно или выше 32, сигнал считали неспецифическим. В дальнейшем проводили ПЦР в реальном времени и оценку C_t для ин-

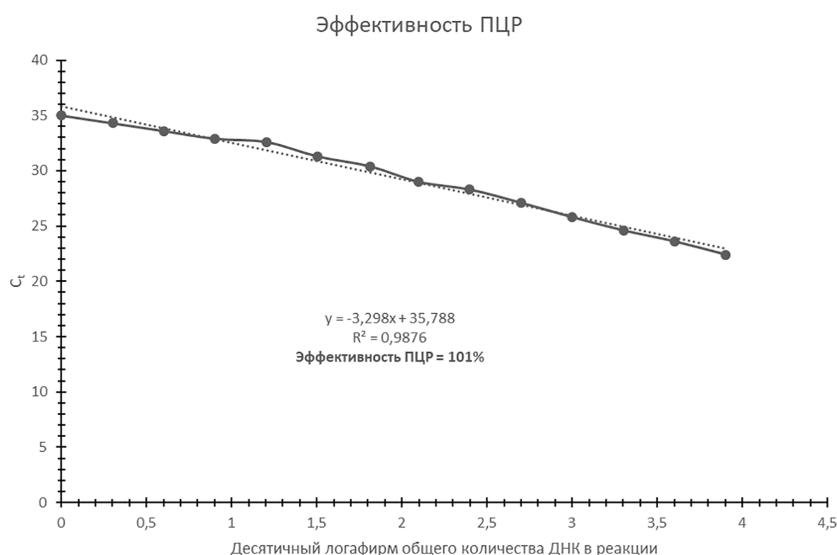


Рис. 1. Оценка эффективности ПЦР, проведенная для референсного гена GAPDH.

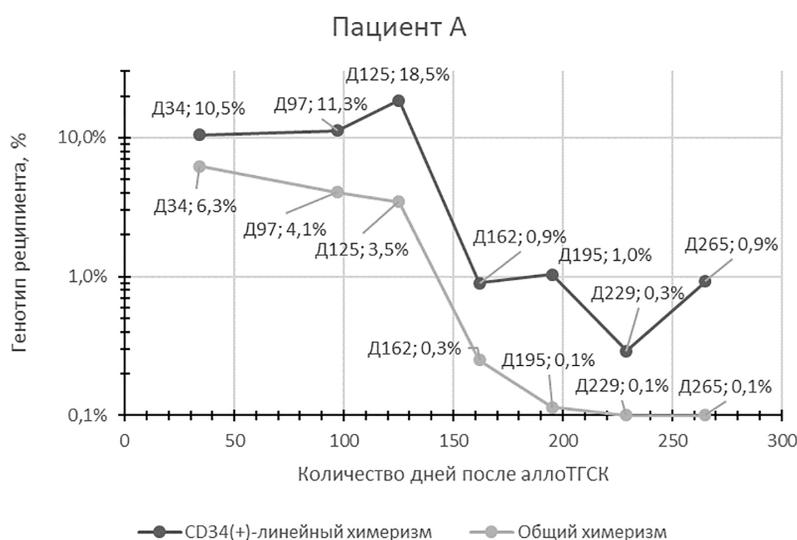


Рис. 2. Мониторинг уровня химеризма для пациента А. после алло ТГСК.

формативного маркера и референсного гена (GAPDH) в трех повторах до трансплантации и после. Данные по C_t до аллотГСК выполняли функцию калибровочного образца при расчетах. Нормализованное значение порогового цикла рассчитывали, как $\Delta C_t = C_t$ (маркера) – C_t (референсного гена). Если исследуемый маркер проявлялся у пациента, и не проявлялся у донора, то такой маркер считали информативным для пациента и наоборот. При нахождении более чем 1 информативного маркера анализ проводился по всем найденным маркерам, но не более 3 маркеров для пары пациент/донор.

Анализ результатов проводили по формуле [2]:

$$QU/QC = 100 * (1+E)^{-(\Delta C_t U - \Delta C_t C)}$$

где QU – количество ДНК в образце после аллотГСК; QC – количество ДНК в образце до аллотГСК; $\Delta C_t U$ – нормализованное значение C_t в образце после аллотГСК; $\Delta C_t C$ нормализованное значение

C_t для калибровочного образца; E – эффективность ПЦР информативного маркера.

Информативность каждого маркера рассчитывали, как отношение количества случаев, когда маркер был информативным, к общему количеству проанализированных пациентов и доноров.

Результаты. При проведении анализа литературных данных [2, 5, 11, 12] установлено, что для всех изученных популяций была показана низкая информативность маркера S05a. Для маркера ACE1428 - высокий уровень неспецифической амплификации [5]. По этим причинам от данных маркеров отказались на этапе формирования панели реагентов. Оценка работоспособности праймеров и ПЦР-микса была проведена при помощи рутинной ПЦР, оценка работоспособности зондов – при помощи ПЦР в реальном времени. В результате оценки работоспособности

зондов, праймеров и ПЦР-микса из финальной панели реактивов исключили маркер S06 из-за низкого уровня сигнала, который не позволял провести количественную оценку.

Все пары реципиент/донор были исследованы по 25 потенциально информативным локусам. Количество найденных информативных маркеров в неродственных парах реципиент/донор составляло от 4 до 13 (медиана – 8,5), в родственных – от 2 до 10 (медиана 5). Следует отметить, что информативных маркеров не было найдено лишь для одного донора.

Теоретически достижимая чувствительность данной методики составляет 0,01% выявляемых клеток [2,5]. Она напрямую зависит от количества ДНК, вносимой в реакцию. Как было ранее показано, максимальная чувствительность достигается при внесении в реакцию 250 нг [2] и 120 нг [5]. Следует отметить, что при внесении в реакцию 15 нг ДНК мониторинг химеризма также возможен, но чувствительность метода снижается до значения около 1% (в зависимости от информативного маркера) [11]. Эта проблема становится особенно актуальной при решении задач мониторинга химеризма в отдельных клеточных линиях, когда невозможно получить исследуемую пробу с высокой концентрацией ДНК (нг) [11]. При проведении оценки эффективности ПЦР при количестве исследуемой ДНК пациента 0,03 нг и ниже (0,042% от 70 нг собственной ДНК) пороговый цикл (C) варьирует между дублями сильнее допустимого значения (0,5 цикла) [5]. Таким образом, если у пациента уровень собственных клеток опускается ниже 0,1%, то данная методика не позволяет провести количественную оценку уровня химеризма с достаточной точностью. На основании этого был сделан вывод, что чувствительность методики составляет не менее 0,1%.

Адаптированная нами методика определения количественного химеризма с использованием InDel ПЦР была внедрена в практику ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. За период с января 2018 по июнь 2019 г. проведена количественная оценка уровня линейного (CD3+, CD34+) и общего химеризма для 28 пациентов клиники Учреждения, получивших аллогенную трансплантацию ГСК. Ниже представлены примеры использования метода в различных клинических ситуациях.

Случай 1. Пациент А., мужчина (41 год). Диагноз: опухоль из бластоидных плазматоидных дендритных клеток. Проведена аллогенная ТГСК от полностью совместимого (10/10) неродственного донора. Мониторинг химеризма проводился на протяжении 265 дней. На рис. 2 изображены данные, полученные при мониторинге химеризма. На +34 сут после трансплантации выявлен высокий уровень собственных клеток как при оценке общего, так и линейного химеризма. На +125 сут наблюдалось дальнейшее повышение содержания собственных клеток в CD34+ - линии до 18,5%. После корректировки терапии на +229 сут уровень общего химеризма достиг предела чувствительности метода (менее 0,1%). Линейный химеризм (CD34+) после снижения на +265 сут установился на уровне 162 и 195 дней.

Случай 2. Пациент В., мужчина (21 год). Диагноз: острый миелоидный лейкоз M₁-вариант. Проведена

Информативность InDel маркеров для различных популяций

Маркер	Информативность маркера в популяции, %				
	Ренн, Франция	Эрланген, Германия	Тайпей, Тайвань	Минск, Беларусь	Киров, Россия
S 01a	23,6	22,6	33,0	47,2	9,7
S 01b	н/д	14,2	13,0	н/д	14,5
S 02	36,4	24,9	5,0	47,2	17,7
S 03	16,4	19,4	27,0	35,1	22,6
S 04a	23,6	20,0	28,0	51,4	12,9
S 04b	12,7	20,0	18,0	11,1	14,5
S 05a	1,8	0,0	0,0	н/д	н/д
S 05b	27,3	24,4	44,0	35,0	16,1
S 06	31,0	25,0	44,0	27,0	н/д
S 07a	31,0	21,1	21,0	47,0	22,6
S 07b	21,8	24,8	36,0	40,5	14,5
S 08a	16,4	18,1	9,0	38,9	12,9
S 08b	20,2	18,4	45,0	32,4	12,9
S 09a	7,3	5,0	2,0	н/д	6,5
S 09b	14,5	23,7	34,0	30,6	21,0
S 10a	25,5	21,6	7,0	н/д	16,1
S 10b	20,2	21,1	29,0	25,0	9,7
S 11a	25,5	24,9	36,0	47,2	12,9
S 11b	7,3	15,0	9,0	25,0	6,5
ACE 1721	н/д	н/д	н/д	30,6	8,1
GST 194	н/д	н/д	н/д	22,2	14,5
MID402	н/д	н/д	н/д	н/д	9,7
MID668a	н/д	н/д	н/д	н/д	19,4
MID668b	н/д	н/д	н/д	н/д	8,1
MID836a	н/д	н/д	н/д	н/д	19,4
MID836b	н/д	н/д	н/д	н/д	11,3
MID847	н/д	н/д	н/д	н/д	11,3
Медиана	21,0	21,1	27,5	35,0	12,9

первая аллогенная ТГСК от полностью совместимого (10/10) неродственного донора. При анализе химеризма на +27 сут выявили более 80% собственных клеток и крайне низкую концентрацию ДНК (C=3 нг/мкл), выделенную из общей популяции клеток костного мозга, что было обусловлено первичным неприживлением трансплантата. Далее была проведена вторая аллогенная ТГСК от гаплоидентичного (5/10) родственного донора. На +32 сут после аллоТГСК наблюдаемый уровень собственных клеток составлял менее 0,8% в общей популяции и 3,2% в CD34+-линии. Далее наблюдалось медленное снижение уровня содержания собственных клеток при мониторинге линейного и общего химеризма (рис. 3). На +159 день мониторинга содержание собственных клеток достигло отметки ниже чувствительности метода (менее 0,1%) при оценке общего и 0,175% при оценке линейного (CD34+) химеризма. На +187 день наблюдалось нарастание уровня собственных клеток в общей популяции и CD34+ - линии. Корректировка терапии способствовала восстановлению донорского химеризма на +209 сут.

Случай 3. Пациент С., мужчина (27 лет). Диагноз: острый лимфобластный лейкоз про-Т-вариант. Про-

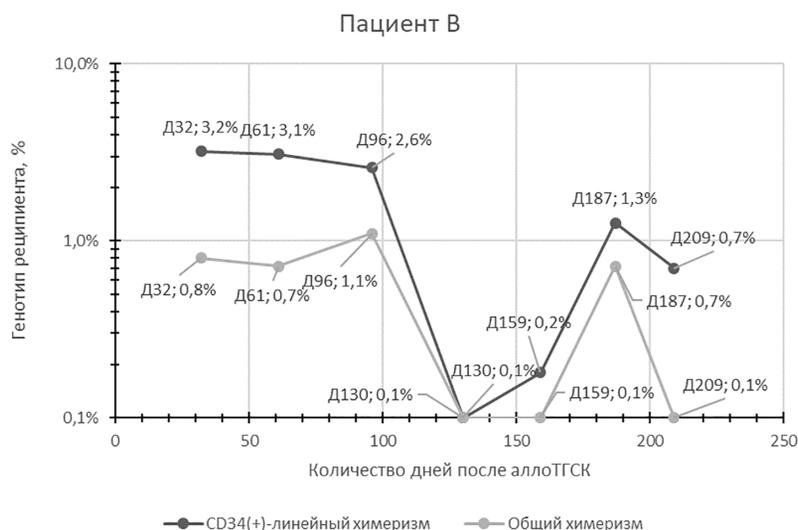


Рис. 3. Мониторинг уровня химеризма для пациента В. после аллотГСК.

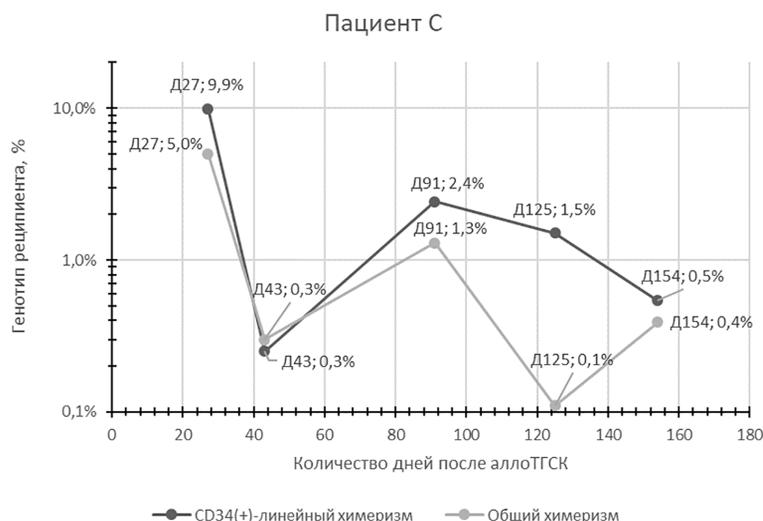


Рис. 4. Мониторинг уровня химеризма для пациента С. после аллотГСК.

ведена аллогенная ТГСК от гаплоидентичного (5/10) родственного донора. На +24 сут наблюдаемый уровень собственных клеток составлял 5% в общей популяции и 9,9% в CD34+-линии. Затем на +41 сут наблюдалось быстрое снижение уровня собственных клеток (рис. 4). На 43 день мониторинга значение собственных клеток достигло отметки 0,31% при оценке общего и 0,25% при оценке линейного (CD34+) химеризма. В дальнейшем процент собственных клеток не превышал 3% как в общей популяции клеток костного мозга, так и в CD34+-линии.

Случай 4. Пациент D., мужчина (38 лет). Диагноз: хронический лимфолейкоз. Проведена аллогенная ТГСК от полностью совместимого (10/10) неродственного донора. На +21 сут наблюдаемый уровень собственных клеток составлял около 40% в общей популяции, CD34+-линии и CD3+-линии. На +70 день мониторинга содержание собственных клеток в костном мозге снизилось до 27% при оценке общего

и 33% при оценке линейного (CD34+) химеризма. Далее на +76 день после аллогенной ТГСК был выполнен повторный анализ химеризма с использованием в качестве исследуемого материала периферической крови. Уровень собственных клеток общей популяции составил 33%, в свою очередь уровень в CD3+-линии составил 9,1% (рис. 5). Указанная картина характерна для острой реакции трансплантат против хозяина [16,17], что подтверждалось клиническими проявлениями. На +128 день после трансплантации уровень собственных клеток пациента в периферической крови составил около 34% в общей популяции и 30% в CD3+-линии.

Обсуждение. Результаты сравнения значений информативности InDel маркеров, полученных для пар реципиент/донор клиники учреждения, с данными других исследований [2, 5, 11, 12] представлены в таблице.

Из данных, представленных в таблице видно, что пары маркеров S09a и S09b, S11a и S11b показа-

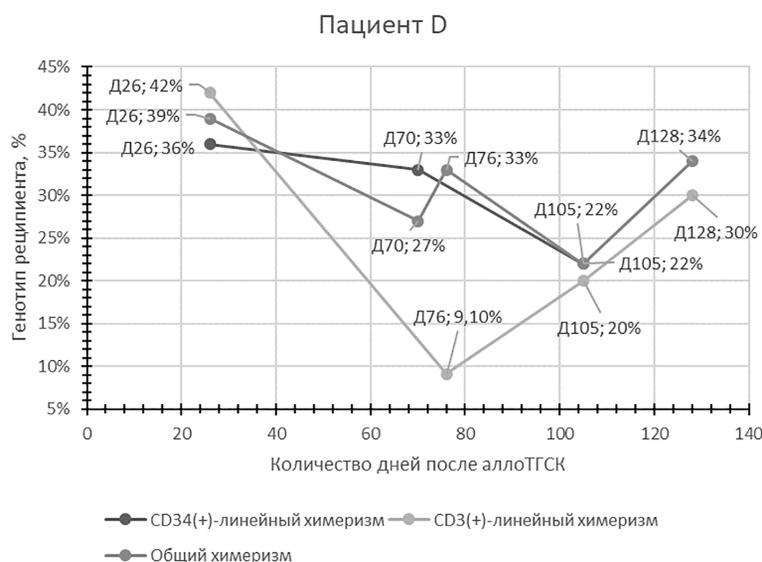


Рис. 5. Мониторинг уровня химеризма для пациента D. после аллотГСК.

ли идентичное соотношение информативности внутри локуса для всех популяций; информативность пар маркеров S01a и S01b, S04a и S04b, S07a и S07b изучаемой популяции оказалась противоположна результатам, полученным ранее для других популяций. Данные по группе парных маркеров S08a и S08b, S10a и S10b имели значительное отличие только по сравнению с данными для тайваньской популяции.

Для оценки соотношения информативности маркеров, при исследовании которых не детектировался второй аллель, проводили сравнение с медианой информативности всех маркеров. В результате было установлено, что маркеры S02 (за исключением тайваньской популяции), S05b, GST194 и ACE1721 обладают схожей информативностью относительно медианы во всех популяциях. Для маркера S03 было установлено значение сильно выше медианного, по сравнению с данными предыдущих исследований, что свидетельствует о высокой информативности маркера для изучаемой выборки.

Часть маркеров (S01a, S09a, S10b, S11b, ACE1721, MID402, MID 668b, MID836b, MID847) обладает невысокой информативностью, по отношению к медиане. В связи с этим было решено выделить эти маркеры в подгруппу низкоинформативных, остальные – в подгруппу высокоинформативных. Использование на первом этапе высокоинформативной подгруппы позволит сократить временные и материальные затраты на этапе поиска маркеров, приемлемых для конкретной пары реципиент/донор. Если этих маркеров будет недостаточно (менее 3 информативных для пациента), то необходимо будет провести поиск по низкоинформативной подгруппе.

Выводы.

Сформированная панель InDel маркеров для мониторинга количественного химеризма успешно апробирована и внедрена в клиническую практику в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

Все маркеры по информативности были разделены на высокоинформативные (информативность не менее 12,9%) – 16 маркеров, низкоинформативные (информативность менее 12,9%) – 9. Учёт информативности потенциальных маркеров позволяет сократить материальные и временные затраты на этап поиска информативных маркеров.

Снижение чувствительности метода до 0,1% не сказалось на прогностической способности метода. При необходимости чувствительность может быть повышена за счет увеличения количества ДНК, используемого в исследовании.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта «УМНИК» (Договор №14113ГУ/2019 (код 0047159)).

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6-9, 11-17 см. REFERENCES)

- Лавриненко В.А., Савицкая Т.В., Волочник Е.В., Марейко Ю.Е., Алейникова О.В. Количественный анализ химеризма после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток молекулярно-генетическими методами. *Онкогематология*. 2014; 9 (2): 29-36.
- Блау О.В. Химеризм после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Клиническая онкогематология*. 2013; 6(1): 34-9.

REFERENCES

- Lukanov T., Ivanova-Shivarova M., Naumova E. Chapter 4. Monitoring of Chimerism Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: *Stem Cells in Clinical Practice and Tissue Engineering*. Rijeka: IntechOpen; 2018: 77-93.
- Alizadeh M., Bernard M., Danic B., Dauriac C., Birebent B., Lapart C. et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*. 2002; 99(12): 4618-25.
- Koldehoff M., Steckel N.K., Hlinka M., Beelen D.W., Elmaagacli

- А.Н. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am. J. Hematol.* 2006; 81(10): 735–46.
4. Scheffer P.G., van der Schoot C.E., Page-Christiaens G.C., Bossers B., van Erp F., de Haas M. Reliability of fetal sex determination using maternal plasma. *Obstet Gynecol.* 2010; 115(1): 117–26.
 5. Lavrinenko V.A., Savitskaya T.V., Volochnik E.V., Mareyko Yu.E., Aleynikova O.V. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with molecular genetic methods. *Onkogematologiya.* 2014; 9 (2): 29–36. (in Russian)
 6. Bader P., Niethammer D., Willasch A., Kreyenberg H., Klingebiel T. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.* 2005; 35(2): 107–19.
 7. Lion T., Watzinger F., Preuner S., Kreyenberg H., Tilanus M., de Weger . et al. The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2012; 26: 1821–8.
 8. Gineikiene E., Stoskus M., Griskevicius L. Recent advances in quantitative chimerism analysis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2009; 9(8): 817–32.
 9. Jacque N., Nguyen S., Golmard J.L., Uzunov M., Garnier A., Leblond V. et al. Chimerism analysis in peripheral blood using indel quantitative real-time PCR is a useful tool to predict post-transplant relapse in acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2015; 50(2): 259–65.
 10. Blau O.V. Chimerism following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2013; 6(1): 34–9. (in Russian)
 11. Bach C., Tomova E., Goldmann K., Weisbach V, Roesler W., Mackensen A., et al. Monitoring of Hematopoietic Chimerism by Real-Time Quantitative PCR of Micro Insertions/Deletions in Samples with Low DNA Quantities. *Transfus. Med. Hemother.* 2015; 42(1): 38–45.
 12. Chen D.P., Tseng C.P., Wang W.T., Wang M.C., Tsai S.H., Sun C.F.. Real-time biallelic polymorphism–polymerase chain reaction for chimerism monitoring of hematopoietic stem cell transplantation relapsed patients. *Clin. Chim. Acta.* 2011; 412 (7–8): 625–30.
 13. Mullaney J. M., Mills R. E., Pittard, W. S. Devine S. E. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Human Molecular Genetics.* 2010; 19 (2): 131–6.
 14. Vali U., Brandstrom M., Johansson M., Ellegren H. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetics.* 2008; 9(1): 8.
 15. Gonzalez K.D., Hill K.A., Li W., Scaringe W.A., Wang J.C., Gu D. et al. Somatic microindels: analysis in mouse soma and comparison with the human germline. *Hum. Mutat.* 2007; 28 (1): 69–80.
 16. Breuer S., Preuner S., Fritsch G, Daxberger H., Koenig M., Poetschger U. et al. Early recipient chimerism testing in the T- and NK-cell lineages for risk assessment of graft rejection in pediatric patients undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia.* 2012; 26(3): 509–19.
 17. Martinez-Laperche C., Noriega V, Kwon M., Balsalobre P., Gonzalez-Rivera M., Serrano D. et al. Achievement of early complete donor chimerism in CD25-activated leukocytes is a strong predictor of the development of graft-versus-host-disease after stem cell transplantation. *Experimental Hematology.* 2015; 43(1): 4–13.

Поступила 14.08.19

Принята к печати 16.09.19

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Долудин Ю.В.¹, Борисова А.Л.¹, Покровская М.С.¹, Стефанюк О.В.¹, Сивакова О.В.¹, Боцова С.А.²,
Мешков А.Н.¹, Метельская В.А.¹, Драпкина О.М.¹

СОВРЕМЕННЫЕ ПЕРЕДОВЫЕ ПРАКТИКИ И РЕКОМЕНДАЦИИ ПО БИОБАНКИРОВАНИЮ

¹ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины Минздрава РФ, 101990,
Москва, Россия;

²ФГБУ 52 Консультативно-диагностический центр Министерства обороны РФ, 125167, Москва, Россия

В современном понимании биобанк – это структура, создаваемая с целью долгосрочного ответственного хранения биологических образцов и ассоциированных с ними данных для их дальнейшего использования в научных и клинических исследованиях.

Задачами биобанкирования являются создание унифицированных рекомендаций по планированию помещений и подбору оборудования для хранения; разработка методов управления и обучения персонала; стандартизация методов сбора, транспортировки, обработки и хранения биоматериала различного происхождения, а также способов контроля качества и валидации применяемых методик; создание и использование баз данных информации, сопровождающей биообразцы. Отсутствие единых стандартов проведения преаналитического этапа долгое время являлось причиной низкой точности и неудовлетворительной воспроизводимости результатов исследований.

К настоящему времени опубликовано большое количество сборников рекомендаций и передовых практик, которые дают ответ на широкий спектр проблем организации процесса биобанкирования. В статье приведен обзор наиболее известных рекомендаций по биобанкированию, которыми можно руководствоваться для решения различных научно-исследовательских задач.

Биобанкирование в России активно развивается. Начиная с 1996 г. ведется работа по законодательному регулированию деятельности в области биобанкирования, в результате которой был издан ряд нормативных документов.

Важным этапом развития биобанкирования в России стало создание в 2018 г. «Национальной ассоциации биобанков и специалистов по биобанкированию» (НАСБио), в состав которой вошли представители медицинских и научно-исследовательских учреждений, коммерческих фирм, квалифицированные специалисты в области биобанкирования. Одной из ключевых задач НАСБио является адаптация и внедрение передовых практик биобанкирования в российских научно-исследовательских институтах и центрах.

Использование современных рекомендаций и практик по биобанкированию приведет к повышению качества проводимых научных исследований и публикаций.

Ключевые слова: биобанк; биобанкирование; передовые практики биобанкирования; рекомендации по биобанкированию; биообразцы.

Для цитирования: Долудин Ю.В., Борисова А.Л., Покровская М.С., Стефанюк О.В., Сивакова О.В., Боцова С.А., Мешков А.Н., Метельская В.А., Драпкина О.М. Современные передовые практики и рекомендации по биобанкированию. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (12): 769-776. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-769-776>

Doludin Y.V.¹, Borisova A.L.¹, Pokrovskaya M.S.¹, Stefanyuk O.V.¹, Sivakova O.V.¹, Botsoeva S.A.², Meshkov A.N.¹, Metelskaya V.A.¹, Drapkina O.M.¹

CURRENT BEST PRACTICES AND BIOBANKING RECOMMENDATIONS

¹FSI National Research Center for Preventive Medicine of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 101990,
Moscow, Russia;

²FSI 52 Consulting and Diagnostic Center of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 125167, Moscow, Russia

The biobank is a structure established with the goal of long-term responsible storage of biological samples and the associated data for their further use in scientific and clinical research.

The objectives of biobanking are the creation of unified recommendations on: the planning of premises and the selection of equipment for storage; development of management methods and staff training; standardization of methods for the collection, shipping, processing and storage of biomaterial of various origins, as well as methods for quality control and validation of the applied methods; creation and use of databases of information accompanying biospecimens. The lack of common standards for conducting the preanalytical phase has been the cause of low accuracy and poor reproducibility of research results.

To date, a large number of guidelines and best practices have been published that provide an answer to a wide range of problems in organizing the biobanking process. The article provides an overview of the most famous biobanking guidelines that can be used to solve various research problems.

Biobanking in Russia is actively developing. Since 1996 there is a work on the legislative regulation of biobanking activities, as a result of which a number of regulatory documents have been issued.

An important stage in the development of biobanking in Russia was the establishment of the “National Association of Biobanks

and Biobanking Specialists” (NASBio) in 2018, which included representatives of medical and research institutions, commercial firms, and qualified specialists in the field of biobanking. One of the key tasks of NASBio is the adaptation and implementation of the best biobanking practices in Russian research institutes and centers.

The use of modern guidelines and best practices on biobanking will lead to an increase in the quality of research and publications.

Key words: *biobank; biobanking; best practices of biobanking; recommendations for biobanking; biospecimens.*

For citation: *Doludin Y.V., Borisova A.L., Pokrovskaya M.S., Stefanyuk O.V., Sivakova O.V., Botsoeva S.A., Meshkov A.N., Metelskaya V.A., Drapkina O.M. Current best practices and biobanking recommendations. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64(12): 769-776. (in Russ.) DOI : <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-769-776>*

For correspondence: *Doludin Yu.V., Scientific Researcher of Biobank; e-mail: doludin@gmail.com*

Information about authors:

Doludin Y.V. <https://orcid.org/0000-0002-0554-9911>
Borisova A.L. <https://orcid.org/0000-0003-4020-6647>
Pokrovskaya M.S. <https://orcid.org/0000-0001-6985-7131>
Stefanyuk O.V. <https://orcid.org/0000-0001-9331-5906>
Sivakova O.V. <https://orcid.org/0000-0001-5397-5387>
Meshkov A.N. <https://orcid.org/0000-0001-5989-6233>
Metelskaya V.A. <https://orcid.org/0000-0001-8665-9129>
Drapkina O.M. <https://orcid.org/0000-0002-4453-8430>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 04.09.2019
Accepted 30.10.2019

Введение. История создания коллекций биологических образцов берет свое начало с XVIII века, когда в передовых университетах Европы впервые применили фиксацию биологических материалов в парафине или формальдегиде. Один из самых известных в России музей антропологии и этнографии им. Петра Великого Российской академии наук (Кунсткамера) – крупнейший и старейший этнографический музей мира, коллекционные фонды которого насчитывают свыше 1,2 млн единиц хранения. Он является преемником первого российского государственного публичного музея – знаменитой Петровской Кунсткамеры, основанной Петром I в 1714 г.

С начала XIX века появляются обширные коллекции образцов человеческих тканей, системы описания материалов. Одновременно с развитием системы общественного здравоохранения понимание роли хранения биологической информации для дальнейших исследований стало значимым на государственном уровне, что в ряде стран привело к законодательному решению о создании коллекций патологических тканей. Таким образом, родились богатейшие коллекции ведущих медицинских учреждений Европы, а также были созданы целые музеи.

Результаты инновационных решений в области хранения биологических материалов, а также усовершенствования в области световой микроскопии в 19 веке позволили выделить патоморфологию в самостоятельную дисциплину, без которой прогресс в изучении физиологии и патофизиологии человека был невозможен.

В XX веке развивалось направление сбора коллекций ограниченного спектра биообразцов и микроорганизмов в профильных лабораториях. К концу XX века появились научно-исследовательские организации, собирающие и хранящие широкий спектр образцов человеческих клеток, тканей и различных биологических жидкостей, с целью научных исследований или для проведения судебно-медицинской экспертизы.

Успехи в области фундаментальных и прикладных биомедицинских наук во многом связаны именно с наличием доступных биологических ресурсов, которые, в сочетании с имеющейся о них информацией, являются чрезвычайно важным материалом для проведения исследований в области инфекционной и неинфекционной патологии человека и животных [1]. В течение последних двух десятилетий количество биомедицинских исследований, проводимых во всем мире, резко возросло. Современный уровень технологий предоставляет возможность длительного хранения биологического материала, что позволяет получить более качественную и обширную информацию о биологических образцах. Важным событием в развитии биомедицинских исследований в XX-XXI веках стало открытие новых классов макромолекул (в основном нуклеиновых кислот и белков), а также новых передовых методов исследования, таких как секвенирование нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS) и масс-спектрометрия. Развитие данных технологий позволило значительно расширить наши знания в геномике, транскриптомике, протеомике и метаболомике. Однако для проведения омикс-исследований необходим биологический материал очень высокого качества. Проблему усугубляет отсутствие единых стандартов на преаналитическом уровне, малейшие вариации в котором могут привести к изменению результатов исследования.

Понятие биобанка. Понятие передовых практик. Отсутствие единых стандартов проведения процедур сбора, обработки и хранения биологических образцов для проведения передовых биомедицинских исследований долгое время являлось причиной низкой точности и неудовлетворительной воспроизводимости результатов [2-5]. В последнее время в качестве одного из подходов к решению данной проблемы специалисты по всему миру рассматривают создание банков биологического материала и развитие биобанкирова-

ния как нового биомедицинского направления. В Государственной программе «Развитие здравоохранения» и Стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 г. отмечено, что для эффективного функционирования системы надзора за заболеваемостью необходимо адекватное информационное обеспечение, уровень которого в значительной мере определяется наличием паспортизированной коллекции биологического материала [6].

Под биобанком долгое время понимали большие коллекции биологических образцов тканей, клеток, крови и ее производных и других физиологических жидкостей, тщательно собираемых для исследовательских целей. Сегодня понятие «биобанк» стало значительно шире и действительно подразумевает отдельное направление, без которого современные исследования в области медицины уже трудно себе представить.

В современном понимании биобанк – это структура, создаваемая с целью долгосрочного ответственного хранения биологических образцов и ассоциированных с ними данных для их дальнейшего использования в научных и клинических исследованиях [7]. В то же время понятие биобанкирования значительно шире. В настоящее время задачами биобанкирования наряду с надлежащим хранением биообразцов являются создание унифицированных рекомендаций по планированию помещения и подбору оборудования для хранения, разработка методологии управления и непрерывного обучения персонала, разработка и стандартизация методов сбора, обработки, хранения и транспортировки, а также способы контроля качества и валидации применяемых методик, создание и использование современных баз данных. Особое внимание уделяется экономическим, юридическим и этическим аспектам биобанкирования.

Биобанкирование активно развивается во всем мире, что позволяет накапливать ценнейший биоинформационный материал. Опыт биобанкирования в разных странах, в организациях разного уровня, с различными задачами по длительному хранению биологического материала неизбежно привел к пониманию необходимости систематизации требований к методологии процессинга биообразцов и выработки единых рекомендаций для хранилищ. Тем не менее развитие биобанкирования происходило параллельно в различных регионах мира со свойственными им особенностями в законодательстве и культуре. В развитии направления биобанкирования участвовали как небольшие научные и клинические центры с собственными локальными задачами, так и крупные организации, чьими целями было решение глобальных задач. Это привело к появлению различных информационных ресурсов по биобанкированию, учитывающих особенности той или иной области медицины.

Результатом коллективно накопленных знаний, навыков, успешных стратегий и методов в области биобанкирования стало возникновение большого количества сборников рекомендаций и передовых практик, в которых можно найти ответы на широкий спектр проблем организации процесса биобанкирования. Наиболее известные среди них следующие:

1) «Передовые практики ISBER: рекомендации для хранилищ», разработанные Международным обществом биологических и экологических репозиториев (ISBER), 2005-2018;

2) Рекомендации Rec (2006) 4 комитета министров Совета Европы государствам-членам об исследованиях биологических материалов человеческого происхождения, 2006-2016;

3) Передовые практики лабораторной медицины, под эгидой отдела лабораторных систем Центров по контролю заболеваний (CDC), 2006-2019;

4) Согласованные передовые практики для центров биологических ресурсов в странах Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), 2001-2012;

5) Передовые практики национального института онкологии (США) (NCI) по источникам биологических образцов («Передовые практики NCI»), 2007-2016;

6) Международный стандарт ISO 20387 «Биотехнологии. Биобанкинг. Общие требования», 2018.

Вкратце рассмотрим вышеперечисленные документы.

Передовые практики ISBER: рекомендации для хранилищ. Международное общество биологических и экологических репозиториев (ISBER) было создано в 1999 г. [8]. ISBER является лидирующим мировым форумом, который занимается гармонизацией научных, технических, правовых и этических вопросов, связанных с репозиториями биологических и экологических образцов.

Среди основных задач ISBER – содействие сотрудничеству, создание возможностей для обучения и профессиональной подготовки в области биобанкирования, организация конференций, рабочих совещаний, мастер-классов для распространения информации о современных тенденциях и результатах исследований. Кроме того, ISBER предоставляет международную площадку для демонстрации инновационных технологий, продуктов и услуг, дает возможность членам ISBER пройти внутренний аудит, общаться с коллегами по актуальным вопросам в интернет-чате «Open Forum». В совокупности эти мероприятия способствуют внедрению лучших практик для широкого спектра репозиториев. Иными словами, ISBER — это крупнейшая международная организация, которая создает возможности для обмена идеями и инновациями в области биобанкирования и гармонизирует подходы к решению всех вопросов в деятельности биологических и экологических репозиториев.

Начиная с 2005 г., в ISBER издаются передовые практики биобанкирования – «ISBER Best Practices», представляющие собой сборники рекомендаций по наиболее эффективным методам управления коллекциями и хранилищами биологических и экологических образцов. Это либо основанные на фактических данных, либо основанные на консенсусе методы сбора, обработки, транспортировки, длительного хранения, извлечения, распространения и утилизации образцов, а также правила хранения и использования информации, сопровождающей биоматериал (описание биообразцов и CRF-таблицы, т.е. паспортизация

образца). Выполнение правил ISBER дает возможность получать доступ к высококачественным биологическим и экологическим образцам для будущих исследований.

Передовые практики ISBER периодически пересматриваются и обновляются с учетом новых достижений в области исследований и технологий. Вышедшее в 2018 г. четвертое издание Best Practices основано на фундаменте, созданном в первых 3-х изданиях, опубликованных в 2005, 2008 и 2012 годах соответственно.

Четвертое издание документа «Передовые практики международного общества биологических и экологических репозиториях (ISBER): рекомендации для хранилищ» является результатом работы международной группы профессионалов в области биобанкирования, представляющих различные организации, в том числе хранилища, специализирующиеся на образцах человека, на биологическом разнообразии, окружающей среде и ветеринарии. В документе описываются основные принципы по сбору, процессингу и хранению образцов, принципы управления и контроля качества, правовые и этические вопросы.

В главе о планировании создания биобанка [9] представлены подробные рекомендации, включая требования к помещениям и оборудованию для пробоподготовки и хранения биобразцов, рекомендации по управлению, документообороту и финансированию хранилища, освещены вопросы валидации методов и контроля качества образцов, тема обучения и повышения квалификации персонала, а также сформулированы положения о безопасности процесса биобанкирования (биологической, химической, пожарной и проч.). Подробно рассмотрены процедуры сбора, обработки и транспортировки образцов, полученных из различных типов биоматериала. В сборнике большое внимание уделено юридическим и этическим аспектам биобанкирования образцов как человеческого, так и иного (нечеловеческого) происхождения. В разделе «Система информационного управления хранилища» указана необходимость программного обеспечения биобанка для хранения информации об образцах (дата взятия, вид биоматериала, объем, местоположение в хранилище и др.), сведений о доноре (пол, возраст, раса, результаты анализов и др.), а также о движении биоматериала.

Рекомендации Rec (2006) 4 комитета министров Совета Европы государствам-членам об исследованиях биологических материалов человеческого происхождения. Совет Европы (СЕ) – международная организация, цель которой состоит в том, чтобы защищать права человека, демократию и верховенство права в Европе. Его деятельность направлена, прежде всего, на обеспечение и защиту прав человека, будь то гражданские, политические, экономические, социальные или культурные права, то есть деятельность СЕ охватывает все сферы жизни человека, в том числе, сферу биомедицинских исследований.

Руководящим органом СЕ является Комитет министров. В сотрудничестве с Парламентской ассамблеей он является хранителем основных ценностей Совета и следит за соблюдением государствами-членами сво-

их обязательств. Деятельность Комитета подразумевает подготовку и заключение конвенций и соглашений, таких как «Конвенция о защите прав человека и человеческого достоинства в связи с применением достижений биологии и медицины: Конвенция о правах человека и биомедицине» (ETS No 164). Однако данная конвенция охватывает только биомедицинские исследования, проводимые непосредственно на людях, и не распространяется на биомедицинские исследования, проводимые на биологическом материале и ассоциированных с ним личных данных, получаемых от пациентов при различных обстоятельствах, порой не связанных с исследованием. До недавнего времени в отношении этих исследований не существовало каких-либо международных норм. Поэтому в 2006 г. Комитет министров СЕ принял рекомендации «Recommendation Rec (2006) 4 of the Committee of Ministers to member states on research on biological materials of human origin» [10]. Данная рекомендация направлена на принятие норм в отношении исследований с использованием биологического материала человеческого происхождения. Основная цель рекомендации состоит в том, чтобы защитить права и основы свободы тех людей, чей биологический материал может быть использован в исследовательских проектах. Кроме того, регулирование в области биомедицинских исследований с использованием биообразцов человека необходимо для укрепления доверия как к врачам, так и к исследовательским процедурам. В этом документе рекомендуется использовать практику информирования пациентов и иных заинтересованных лиц и необходимость запрашивать их согласие в случаях, когда их биологические материалы предполагается использовать для научных исследований.

Данная рекомендация основывается на принципах, воплощенных в «Конвенции о защите прав человека и человеческого достоинства в связи с применением достижений биологии и медицины» (ETS No. 164, 1997, Конвенция о правах человека и биомедицине) и в Дополнительном Протоколе к ней о биомедицинских исследованиях (CETS No. 195, 2005), направленных на защиту прав и достоинства человека в связи с исследованиями на биологическом материале, полученном от человека, таких как органы, ткани и клетки. При использовании биоматериалов человеческого происхождения для проведения биомедицинских исследований часто необходимы и личные данные (например, сведения из медицинской карты или журнала регистрации, связанного с состоянием здоровья, например, журнала регистрации онкологических больных). В то же время благодаря проведению медицинских исследований и анализу биологического материала человека формируются новые данные. Первичные сведения о пациентах, полученные для исследовательских проектов, и новые данные, получаемые в ходе этих исследований, также относятся к сфере действия этого Дополнительного Протокола.

В 2016 г. рекомендации были дополнены документом «Recommendation N CM/Rec (2016) 6 of the Committee of Ministers to member States on research on biological materials of human origin» (Рекомендации CM/Rec (2016) 6 комитета министров Совета Европы

государствам-членам об исследованиях биологических материалов человеческого происхождения, принята Комитетом министров 11 мая 2016 г. на 1256-м заседании постоянных представителей министров).

Передовые практики лабораторной медицины, под эгидой Отдела лабораторных систем Центров по контролю заболеваний (CDC).

Центры по контролю заболеваний (CDC) США являются Федеральным агентством Министерства здравоохранения США, созданном в 1946 г. Отдел лабораторных систем [11] CDC в 2006 г. выступил спонсором инициативы «Лучшая практика лабораторной медицины» (Laboratory Medicine Best Practices, LMBP) и адаптировал методы оценки эффективности, используемые в настоящее время в медицине и здравоохранении, для лабораторной медицины с целью улучшения качества лабораторных исследований. CDC проводит систематические обзоры методологий, предоставляет информацию о сравнительной эффективности различных практик лабораторной медицины и содействует созданию общей площадки для обмена опытом.

В отличие от других практик, LMBP не собраны в единый сборник рекомендаций. На сайте регулярно размещается большое количество различных статей, посвященных различным аспектам лабораторной медицины, а также систематические обзоры, в которых дается анализ решения различных проблем в лабораторных практиках [12].

Согласованные передовые практики для центров биологических ресурсов в странах Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР). Международной Организацией экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), основанной в Париже в 1961 г., были разработаны и изданы два документа, содержащие рекомендации для хранилищ биологических материалов:

1. OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres

В целях удовлетворения потребностей современной биотехнологии, ОЭСР в 2001 г. внедрила новую концепцию хранилищ и поставщиков высококачественных биологических материалов и информации: центры биологических ресурсов (ЦБР) [13]. ЦБР считаются одним из ключевых элементов устойчивой международной научной инфраструктуры, которая необходима для успешного использования преимуществ биотехнологии, будь то в сфере здравоохранения, промышленном секторе или других областях. Первым шагом в этом направлении стало издание в 2001 году экспертами из стран ОЭСР консенсусного доклада, в котором к национальным правительствам был обращен призыв принять ряд мер для приведения концепции ЦБР в соответствие с международным научным сообществом.

В докладе за 2007 г. представлены результаты обсуждений, проведенных странами-членами ОЭСР совместно с рядом ключевых стран-партнеров под эгидой целевой группы экспертов, учрежденной рабочей группой ОЭСР по биотехнологии. В данном докладе были учтены рекомендации, содержащиеся в документе 2001 г. В ходе широких консультаций с научным

сообществом был разработан ряд передовых методов для ЦБР, которые призваны служить целевым показателем (стандартом) для управления качеством коллекций и стать руководством для тех, кто стремится улучшить качество биообразцов и ассоциированных с ними данных [14]. На многие ЦБР возложена задача поддержания и сохранения опасных биологических ресурсов и обмена ими. В руководстве ОЭСР для ЦБР 2007 г. описываются методы и протоколы безопасного хранения и предоставления биологических материалов, представляющих биологическую опасность.

Документ OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres состоит из двух частей. Первая часть содержит общую информацию о функциях биобанков, требованиях к финансированию, менеджменту качества и квалификации персонала. Во второй части подробно описаны наилучшие практики, касающиеся: общих аспектов качества; вопросов, связанных с биологической безопасностью; рекомендаций для биобанков, хранящих биоматериал человеческого происхождения; рекомендаций для биобанков, хранящих микроорганизмы. Последнее обновленное издание «OECD Best Pract. Guidel. Biol. Resour. Centres» вышло в 2012 г.

2. Guidelines for Human Biobanks and Genetic Research Databases (HBGRDs)

Биомедицинские исследования, включающие генетическую информацию человека, анализируемую в сочетании с его личными и медицинскими данными, являются на сегодняшний день особенно перспективными и, несомненно, имеют решающее значение для профилактики, выявления, диагностики и лечения многих заболеваний. Использование человеческого генетического материала и ассоциированной с ним информации, не лишено некоторых противоречий. В научном сообществе существует консенсус в отношении того, что прогресс в понимании причин и механизмов развития болезней будет зависеть от создания, согласования и широкого использования биобанков человеческого биоматериала и баз данных генетических исследований.

Биобанки и базы данных генетических исследований, которые объединяют и позволяют обмениваться биологическим материалом человека и информацией, полученной в результате его анализа, являются ключевым элементом научной инфраструктуры, лежащей в основе таких исследований.

В октябре 2009 г. Совет международной Организации экономического сотрудничества и развития принял рекомендации о биобанках биообразцов человека и базах данных генетических исследований «Guidelines for Human Biobanks and Genetic Research Databases (HBGRDs)», в которых содержатся руководящие принципы создания, управления, эксплуатации, доступа, использования и прекращения работы HBGRDs. Одной из основных целей HBGRDs является содействие научным исследованиям и облегчение широкого доступа к данным и материалам, касающимся биомедицинских достижений, при одновременном обеспечении того, чтобы исследования проводились с соблюдением всех этических требований к биобанкированию, основных прав и свобод человека [15, 16].

Передовые практики национального института онкологии (США) (NCI) по источникам биологических образцов («Передовые практики NCI»). Национальный институт онкологии (National Cancer Institute, NCI) является подразделением Национального института здравоохранения США (National Institutes of Health, NIH) министерства здравоохранения и социальных служб США. NCI, созданный в соответствии с Законом о Национальном институте рака 1937 г., является основным учреждением федерального правительства по исследованиям и образованию в области рака. Национальный закон о раке 1971 г. расширил сферу и обязанности NCI и утвердил Национальную программу борьбы с раком.

NCI инициировал программу (Cancer Diagnosis Program, CDP), направленную на улучшение качества диагностики и оценки прогноза развития рака путем эффективного внедрения новых научных знаний в клиническую практику. Эта национальная программа стимулирует, координирует и финансирует ресурсы и исследования для разработки инновационных методов диагностики рака *in vitro*. CDP поддерживает исследования в медицинских центрах, больницах, компаниях и университетах на всей территории США. В осуществление программы диагностики рака вовлечены четыре подразделения: отдел биологических репозитория и исследований биологических образцов (The Biorepositories and Biospecimen Research Branch, BBRB), отдел диагностических биомаркеров и технологий (Diagnostic Biomarkers and Technology Branch, DBTB), отдел оценки диагностики (Diagnostics Evaluation Branch, DEB), отдел патологических исследований и ресурсов (Pathology Investigation and Resources Branch, PIRB).

BBRB разрабатывает биорепозиторийные стандарты, что содействует научным исследованиям. Работа с качественными биологическими образцами составляет основу доказательной практики для клинических исследований в области онкологии и других биомедицинских исследований, в которых используются биологические образцы. BBRB разрабатывает и постоянно совершенствует методики сбора, обработки и хранения биообразцов, осуществляет разработку и поддержку научных исследований и программ, которые информируют о передовом опыте сбора, процессинга и обработки биообразцов, курирует форумы для общения по вопросам, связанным с биобанкированием, осуществляет налаживание партнерских отношений на национальном и международном уровнях для координации и распространения стандартов биобанкирования, а также для облегчения доступа к биообразцам. Кроме того, BBRB занимается обеспечением поддержки программ и инициатив NCI и NIH, которые включают сбор и использование биологических образцов.

За последние несколько лет NCI провел интенсивную работу по разработке методических рекомендаций по биобанкированию с целью повысить качество биологических образцов, используемых в исследованиях рака. Передовые практики NCI (NCI Best Practices for Biospecimen Resources) разработаны на основе обширных исследований, проводимых

с привлечением ведущих экспертов в области биобанкирования и научных исследований. В документе подробно описаны операционные, технические, этические и правовые вопросы, связанные с получением, хранением и использованием биологических образцов, используемых в исследованиях онкологических заболеваний [17].

В этом документе определены основные руководящие принципы, которые определяют передовые методы использования биологических образцов и данных, ассоциированных с ними, а также этические и правовые аспекты. Последнее издание NCI Best Practices 2016 г. не включает подробные лабораторные процедуры; скорее документ состоит из принципов, с помощью которых такие процедуры должны разрабатываться. Рекомендации, содержащиеся в этом документе, должны быть адаптированы, в зависимости от обстоятельств, с учетом тематики научных исследований и видов биообразцов. Хотя NCI Best Practices являются рекомендательными, NCI считает, что принципы, изложенные в этом документе, необходимо применять в научно-исследовательских программах.

ISO 20387 «Биотехнологии. Биобанкинг. Общие требования». Стремительное развитие биобанкирования в мире потребовало разработки специализированного международного стандарта. Значимым событием 2018 г. стало опубликование первого стандарта по биобанкированию ISO 20387:2018 «Биотехнологии. Биобанкинг. Общие требования» [18].

Рабочая группа по биотехнологии Международной Организации по стандартизации (ISO) /TC276 (Технический комитет 276) была создана в 2013 г. На сегодняшний день в ее состав входят специалисты из 30 стран-участников, 14 стран-наблюдателей и 7 международных организаций, включая мировых лидеров в этой области ISBER, BBMRI-ERIC (Biobanking and BioMolecular resources Research Infrastructure) и ESBB (European, Middle Eastern and African Society for Biobanking) [19].

Уникальность документа ISO 20387:2018 «Биотехнологии. Биобанкинг. Общие требования» заключается в том, что он применим ко всем организациям, осуществляющим биобанкирование любого биоматериала, в том числе микроорганизмов и биологического материала из многоклеточных организмов (человека, животных, растений, грибов) в научно-исследовательских целях [18, 20].

Значительный вклад в разработку данного стандарта внесло международное общество биологических репозитория и репозитория окружающей среды (ISBER). Основу стандарта в значительной степени составляет третье издание передовых практик биобанкирования ISBER Best Practices.

Стандарт содержит разделы, регламентирующие требования к структуре и ресурсам биобанка, компетентности персонала и процессу биобанкирования, а также определяет перечень документации, необходимой для деятельности биобанка.

Примечательно, что в окончательной редакции стандарта появился раздел, описывающий требования к системе менеджмента качества, в котором говорится, что любой биобанк должен создать, документиро-

вать, внедрять и поддерживать систему менеджмента качества, способную демонстрировать последовательное выполнение требований данного документа и обеспечение качества биобанкирования.

Развитие биобанкирования в России. Биобанкирование играет важную роль в развитии персонализированной медицины и снижении смертности в обществе, является необходимым направлением развития в области медико-биологических исследований. В связи с этим Министерство здравоохранения Российской Федерации поставило задачу создать к 2020 г. в стране полноценную сеть биобанков, депозитариев и коллекций биоматериалов. Важным этапом в реализации этой задачи стало создание «Национальной ассоциации биобанков и специалистов по биобанкированию» (НАСБио) [21], в состав которой вошли представители медицинских и научно-исследовательских учреждений, а также коммерческих фирм, осуществляющих деятельность в сфере биобанкирования. Новая площадка позволяет всем заинтересованным сторонам иметь доступ к наиболее актуальной информации и быстро находить общие взаимосвязи с другими участниками.

Среди приоритетных целей НАСБио – внедрение единых стандартов биобанкирования и системы менеджмента качества, призванной контролировать выполнение стандартов. Стандартизация всех этапов позволит не только обеспечить высокое качество образцов данных и согласованность действий участников процесса, но и интегрироваться в мировую сеть. Объединенные в общую систему российские биобанки позволят накапливать необходимое количество биообразцов для научных исследований в самых разных областях биомедицинской науки. Это может быть особенно актуально при планировании и проведении крупных национальных проектов, а также при изучении редких заболеваний.

В Российской Федерации наряду с эволюцией биобанкирования развивается и правовая поддержка отрасли. С 1996 г. в нашей стране уделяется особое значение государственному регулированию в области генно-инженерной деятельности (№ 86-ФЗ от 05.07.1996 г.), что определило развитие биобанкирования в правовом поле. На сегодняшний день деятельность в области биобанкирования регулируется следующими законодательными актами: Федеральный закон от 23.06.2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах», ч.3 ст.37; Приказ Минздрава России от 20.10.2017 г. № 842н «Об утверждении требований к организации и деятельности биобанков и правил хранения биологического материала, клеток для приготовления клеточных линий, клеточных линий, предназначенных для производства биомедицинских клеточных продуктов, биомедицинских клеточных продуктов» (зарегистрировано в Минюсте России 28.03.2018 № 50555); Федеральный закон от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в РФ» (с изменениями и дополнениями); Федеральный закон от 27.07.2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных» (действующая редакция); Федеральный закон от 05.07.1996 г. № 86-ФЗ «О государ-

ственным регулировании в области генно-инженерной деятельности» (с изменениями и дополнениями); Федеральный закон от 03.12.2008 г. № 242-ФЗ «О государственной геномной регистрации в Российской Федерации» (с изменениями и дополнениями). Однако федерального закона по биобанкированию, который мог бы на законодательном уровне собрать воедино и утвердить стандарты биобанкирования в России, пока нет.

Заключение. Создание и хранение коллекций биологического материала, развитие технологий на современном этапе привело к формированию новой отрасли биомедицинской науки – биобанкированию.

Данное направление получило свое развитие в связи с острой необходимостью в стандартизации преаналитического этапа исследований. Единые подходы к процедурам сбора, процессинга и хранения биообразцов позволят решить проблему воспроизводимости данных и уменьшить количество ошибок, возникающих на преаналитическом этапе исследований. В настоящий момент существует большое количество практик и рекомендаций по биобанкированию. Передовые практики описывают не только процедуры сбора и хранения образцов, но также освещают вопросы управления и контроля качества, правовые и этические аспекты биобанкирования. При этом большинство практик не сводятся к набору стандартных операционных процедур (СОП) и форм, а представляют собой принципы, которыми следует руководствоваться при создании биобанка и развитии биобанкирования в научных и клинических центрах с дальнейшей адаптацией их под конкретные цели и задачи. На сегодняшний день является актуальным как перевод на русский язык ISO 20387 и его распространение среди специалистов, так и разработка российских передовых практик и рекомендаций для биобанков и биоресурсных коллекций, базирующихся на новейших международных документах и учитывающих специфику российской законодательной базы в данной сфере, а также особенности российских медицинских научных и образовательных центров.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (2-5, 7-8, 10-20 см. REFERENCES)

1. Семенов Т.А., Ананьина Ю.В., Боев Б.В., Гинцбург А.Л. Банки биологических ресурсов в системе фундаментальных эпидемиологических и клинических исследований. *Вестник РАМН*. 2011; 10: 5-9.
2. Семенов Т.А., Акимкин В.Г. Серозидемиологические исследования в системе надзора за вакциноуправляемыми инфекциями. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 2: 87-94.
3. Анисимов С.В., Глотов А.С., Гранстрем О.К., Драпкина О.М. и др. Биобанки и прогресс биомедицины. Сборник научных трудов. Анисимов С.В., ред. Санкт-Петербург: Свое издательство; 2018; 86.
4. Сайт: Национальная ассоциация биобанков и специалистов по биобанкированию – URL: <http://nasbio.ru/>

REFERENCES

1. Semenenko T.A., Anan'ina Yu.V., Boev B.V., Gintsburg A.L. Banks of biological resources in the system of basic epidemiological and clinical studies. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2011;(10): 5-9. (in Russian)
2. Prinz F., Schlange T., Asadullah K. Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? *Nature reviews Drug discovery*. 2011;10(9):712.
3. Begley C.G., Ellis L.M. Drug development: Raise standards for pre-clinical cancer research. *Nature*. 2012;28;483(7391): 531.
4. Economist T. Problems with scientific research: How science goes wrong. *The Economist*. 2013.
5. Massett H.A., Atkinson N.L., Weber D., Myles R., Ryan C., Grady M., Compton C. Assessing the need for a standardized cancer Human Biobank (caHUB): findings from a national survey with cancer researchers. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 2011; 42: 8-15.
6. Semenenko T.A., Akimkin V.G. Seroepidemiology in the surveillance of vaccine-preventable diseases. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; 2: 87-94. (in Russian)
7. Hallmans G., Vaught J.B. Best practices for establishing a biobank. *In Methods in Biobanking* 2011;675(1): 241-60.
8. ISBER. Annual report 2018. *ISBER International Society for Biological And Environmental Repositories*. 2018.
9. Anisimov S.V., Glotov A.S., Granstrem O.K., Drapkina O.M. et al. Biobanks and biomedical progress [Biobanki i progress biomeditsiny]. St.Petersburg: Svoyo izdatel'stvo. 2018; 86. (in Russian)
10. Council of Europe, Committee of Ministers. Recommendation Rec(2006)4 of the Committee of Ministers to Member States on Research on Biological Materials of Human Origin. *Jahrbuch Für Wissenschaft Und Ethik*. 2008;11(1): 387-94.
11. WEB: Division of Laboratory Systems (DLS) – URL: <https://www.cdc.gov/labbestpractices/index.html>
12. WEB: Centers for Disease Control and Prevention. Publications & Reports LMBP – URL: <https://www.cdc.gov/labbestpractices/our-findings.html>
13. Ozerskaya S.M. OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centers. *OECD*, 2007. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008;44(5): 559-60.
14. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD best practice guidelines for biological resource centre . *OECD*. 2007; 2.
15. Chalmers D. Genetic research and biobanks. *Methods Mol. Biol*. 2011;675:1-37.
16. OECD guidelines on human biobanks and genetic research databases. *Eur. J. Health Law*. 2010;17(2):191-204.
17. National Cancer Institute. NCI Best Practices for Biospecimen Resources. Biorepositories and Biospecimen Research Branch National Institutes of Health Table of Contents. *National Cancer Institute*; 2016.
18. ISO 20387:2018 Biotechnology – Biobanking – General requirements for biobanking.
19. Furuta K., Allocca C.M., Schacter B., Bledsoe M.J., Ramirez N.C. Standardization and innovation in paving a path to a better future: An update of activities in ISO/TC276/WG2 biobanks and biorepositories. *Biopreservation and biobanking*. 2018;16(1): 23-7.
20. Krieger L. New ISO standards for biobanking in development – ISO objectives and involvement. *Biobanks Europe*. 2017;6: 20-1.
21. WEB: National Association of Biobanks and Biobanking Specialists. URL: <http://nasbio.ru/> (in Russian)

Поступила 04.09.19

Принята к печати 30.10.19