ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"»

ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ «НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО СПЕЦИАЛИСТОВ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Том 65
1 • 2020

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ЯНВАРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес
ОАО «Издательство"Медицина"»
115088, Москва, Новоостаповская 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 08.01.2020.
Подписано в печать 15.01.2020.
Формат 60 × 88⅛.
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 Micology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (Print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EMBASE, Elsever 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: wwwakc.ru, www-pressa-rf.ru
Подписка на электронную версию: elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика. 2020. № 1. 1–72.

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*), A. 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"

Diagnostika KLINICHESKAYA LABORATORNAYA

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Volume 65
1 • 2020

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JANUARY

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 permition 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, Elsever 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 (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MAVZYTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)

IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Лысцова Н.Л., Петелина Т.И., Гапон Л.И., Авдеева К.С., Быкова С.Г., Суплотов С.Н.
Роль витамина D в патогенезе развития артериальной гипертонии 5

Иванов В.И., Дорофейков В.В., Кайстря И.В. , Эмануэль В.Л.
Витамин D и лабораторные показатели сердечно-сосудистого риска у пожилых 11

ИММУНОЛОГИЯ

Шпилевая М. В., Рунина А. В., Филиппова М.А., Кубанов А. А.
Сравнение иммуночипов для диагностики сифилиса, выполненных по технологии сополимеризационной иммобилизации и методом бесконтактной печати 16

Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Носик Д.Н.
Изучение показателей врождённого и приобретённого клеточного иммунитета периферической крови пациентов с ВИЧ-инфекцией 24

Мавзютов А.Р., Бондаренко К.Р., Мавзютова Г.А., Глазутдинова Л.Р.
Клинико-лабораторные параллели при ассоциируемых с липополисахаридами грамотрицательных бактерий патологических и пограничных состояниях 29

МИКРОБИОЛОГИЯ

Шипицына И. В., Осипова Е. В., Овчинников Е. Н., Леончук Д. С.
Зависимость биопленкообразующей способности от антибиотикочувствительности клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у пациентов с хроническим остеомиелитом 37

Червинец В. М., Миронов А. Ю., Червинец Ю. В., Базлов С.Н.
Состояние и значение микробиоценозов пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки при язвенной болезни, хроническом гастрите, эзофагите 42

Козлов А.В., Лямин А.В., Жестков А.В., Гусякова О.А., Попова Е.И., Железнова Е.А.
Структура условно-патогенной микрофлоры, выделенной из урогенитального тракта женщин при патологическом течении беременности 50

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тамарова Э.Р., Швец К.Ю., Мавзютов А.Р., Баймиев Ал.Х., Булгакова А.И.
Создание молекулярно-генетической тест-системы для ранней диагностики и оценки эффективности лечения воспалительных заболеваний пародонта 55

Останкова Ю. В., Семёнов А. В., Зуева Е.Б., Ногойбаева К.А., Касымбекова К.Т.,Тобокалова С.Т., Тотолян Арег А.
Распространённость клинически значимых мутаций вируса у больных хроническим вирусным гепатитом В 61

Петруша О.А., Файзулоев Е.Б.
Методы детекции результатов реакции петлевой изотермической амплификации ДНК 67

© ОАО «Издательство "Медицина"», 2020

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

Lystsova N.L., Petelina T.I. , Gapon L.I., Avdeeva K.S., Bycova S.G., Suplotov S.N.
The role of vitamin D in the pathogenesis of the arterial hypertension 5

Ivanov V.I. , Dorofeykov V.V. , Kaystrya I.V. , Emanuel V.L.
Vitamin D and laboratory indicators of cardiovascular risk in the elderly 11

IMMUNOLOGY

Shpilevaya M.V., Runina A.V., Filippova M.A., Kubanov A.A.
Comparison of immunoarrays for syphilis diagnostics produced by co-polymerization immobilization and non-contact printing techniques 16

Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A., Selimova L.M., Kalnina L.B., Nosik D.N.
The study of the innate and acquired cellular immunity chains indicators in the peripheral blood of patients with hiv infection 24

Mavzyutov A.R., Bondarenko K.R., Mavzyutova G.A., Glazutdinova L.R.
Clinical and laboratory parallels at pathological and borderline states associated with lipopolysaccharides of gram-negative bacteria . . . 29

MICROBIOLOGY

Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Ovchinnikov E. N., Leonchuk D. S.
Dependence of biofilm-forming ability on the antibiotic sensitivity of Pseudomonas aeruginosa clinical strains isolated from patients with chronic osteomyelitis 37

Chervinets V.M., Mironov A.Yu., Chervinets Yu.V., Bazlov S.N.
The state and role of esophagus, stomach, intestinal microbiota in patients with ulcer disease, chronic gastritis, esophagitis 42

Kozlov A.V., Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Gusyakova O.A., Popova E.I., Zheleznova E.A.
The structure of conditionally pathogenic microflora, isolated from the urogenital tract of women with pathological course of pregnancy 50

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

Tamarova E.R. , Shvets K.Yu., Mavzyutov A.R., Baimiev Al.H., Bulgakova A.I.
Creation of a molecular genetic test system for early diagnostics and evaluation of effectiveness of treatment of inflammatory periodontal diseases 55

Ostankova Yu. V., Semenov A. V. , Zueva E.B., Nogoybaeva K.A., Kasymbekova K.T.,Tobokalova S.T., Totolian Areg A.
The prevalence clinically significant virus mutations among patients with chronic viral hepatitis B 61

Petrusha O.A., Faizuloev E.B.
Detection methods for results of a loop-mediated isothermal amplification of DNA 67

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-5-10

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Лысцова Н.Л.[1], Петелина Т.И.[1,2], Гапон Л.И.[1], Авдеева К.С.[1], Быкова С.Г.[1], Суплотов С.Н.[2]

РОЛЬ ВИТАМИНА D В ПАТОГЕНЕЗЕ РАЗВИТИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

[1]Тюменский кардиологический научный центр, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, 625026, Тюмень, Россия;
[2]ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 625013, Тюмень Россия

В последние годы накоплены многочисленные данные о патогенетических звеньях формирования артериальной гипертонии. В ряде исследований показано, что дефицит витамина D, ассоциируясь с возрастом, изменением полового гормонального статуса, повышением тонуса ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, дисфункцией эндотелия, нарушением кальциевого обмена, может являться одним из механизмов развития и прогрессирования артериальной гипертонии. Целью обзора явилось обобщение результатов оригинальных отечественных и зарубежных исследований, проспективных наблюдений и метаанализов по взаимосвязи между дефицитом витамина D и артериальной гипертонией.

Ключевые слова: *артериальная гипертония; витамин D.*

Для цитирования*: Лысцова Н.Л., Петелина Т.И., Гапон Л.И., Авдеева К.С., Быкова С.Г., Суплотов С.Н. Роль витамина D в патогенезе развития артериальной гипертонии. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1): 5-10.*

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-5-10

Lystsova N.L.[1], Petelina T.I.[1,2], Gapon L.I.[1], Avdeeva K.S.[1], Bucova S.G.[1], Suplotov S.N.[2]

THE ROLE OF VITAMIN D IN THE PATHOGENESIS OF THE ARTERIAL HYPERTENSION

[1]Tyumen Cardiology Research Center, Tomsk National Research Medical Center RAS, 625026,Tyumen, Russia;

[2]Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Tyumen State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation 625013,Tyumen, Russia

In recent years, accumulated numerous data on the pathogenetic links of the formation of arterial hypertension. A number of studies have shown that vitamin D deficiency, associated with age, changes in sex hormonal status, increased tone of the renin-angiotensin-aldosterone system, endothelial dysfunction, and calcium metabolism, can be one of the mechanisms of development and progression of arterial hypertension. The purpose of the review was to summarize the results of the original domestic and foreign studies, prospective observations and meta-analyzes on the relationship between vitamin D deficiency and arterial hypertension.

Keywords: *arterial hypertension; vitamin D.*

For citation: *Lystsova N.L., Petelina T.I., Gapon L.I., Avdeeva K.S., Bucova S.G., Suplotov S.N. The role of vitamin D in the pathogenesis of arterial hypertension. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (1): 5-10 (in Russ.). DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-1-10*

For correspondence: *Petelina Tatiana Ivanovna*, MD, Leading Researcher of the Department of Arterial Hypertension and Coronary Insufficiency; e-mail: petelina@infarkta.net

Information about the authors:

Lystsova N.L., http :// orsid. org/ 0000- 0002-3401-6794
Petelina T.I., http:// orsid. org/ 0000-0001-6251-4179
Gapon L.I., http:// orsid. org/ 0000-0002-3620-0659
Avdeeva K.S., http :// orsid. org/ 0000-0002-2134-4107
Suplotov S.N., http:// orsid. org/ 0000-0002-1736-4084

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 21.10.2019
Accepted 20.11.2019

Артериальная гипертония (АГ) относится к наиболее распространенным сердечно-сосудистым заболеваниям. Экспертное сообщество регулярно создает рекомендации по определению, диагностике и лечению АГ [1]. В последние годы в качестве неклассического фактора, способного оказывать влияние на риск развития социально значимых заболеваний, включая АГ, рассматривается дефицит витамина D.

Повышенный интерес к витамину D и оценке D-витаминного статуса обусловлен рядом причин, выходящих за пределы традиционных представлений об

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

этом витамине. Уникальность витамина D, по сравнению с другими витаминами, связана с многообразным его влиянием на организм в целом и возможностью профилактики и лечения различных заболеваний, так как множество заболеваний у лиц молодого, среднего и пожилого возраста непосредственно ассоциировано с дефицитом или недостаточным количеством витамина D в крови [2].

Термин «витамин D» объединяет группу сходных по химическому составу форм витамина D, относящихся к производным стеринов. В настоящее время витамин D рассматривается как комплекс близких по биологической активности, но не по происхождению, витаминов D_2 (эргокальциферол) и D_3 (холекальциферол). Оба витамина гормонально инертны, но, поступая в печень, они метаболизируются до 25-гидроксихолекальциферола – $25(OH)D_3$ (кальцидиола), который является главным циркулирующим метаболитом витамина D, имеет период полураспада 15 дней и служит в качестве основного биомаркера оценки D-витаминного статуса, а далее с помощью кальциферолтранспортных белков он поступает в почки и под воздействием паратгормона превращается в 1,25-дигидроксихолекальциферол – $1,25(OH)_2D_3$ (кальцитриол), гормональная активность которого в 10-100 раз выше, чем кальцидиола [2,3].

Современные представления о биологических эффектах D-гормона разнообразны. Они связаны с открытием рецептора витамина D (Vitamin D Receptors, или VDR) и его идентификацией практически во всех органах и тканях человеческого организма (молочная железа, кишечник, почки, гладкомышечные клетки и эндотелий сосудов, простата, яичник, головной мозг, кожа и других органах), кроме того, раскрыта его регуляторная (сигнальная) роль в процессах клеточного роста и дифференцировки, апоптоза, иммуномодулирования, ангиогенеза, инициирования системного воспаления путем активирования более 60 генов [2,3].

Также эксперты Международного эндокринологического общества провели анализ доказательной базы по внескелетным эффектам витамина D и считают, что его недостаточность и дефицит ассоциируются с увеличением риска развития некоторых форм онкологий, сердечно-сосудистих патологий, нарушений углеводного обмена, болезней нервной системы, отклонений репродуктивной функции, аутоиммунных заболеваний [2, 4, 5].

Такая специфичность эффектов связана с тем, что наиболее активный метаболит витамина D – кальцитриол активируется только при связывании с высокоаффинным ядерным VDR-рецептором. Широко представленный в тканях и клетках рецептор локализован на плазматических мембранах или в цитолизе клеток. После связывания с любой формой VDR кальцитриол в виде комплекса перемещается в ядро, где взаимодействует с рецептором цис-ретиноевой кислоты с образованием гетеродимера, что приводит к процессу индуцирования экспрессии генов – мишеней. Таким образом, геномные эффекты кальцитриола принимают участие в разнообразных биологических процессах, включая пролиферацию, дифференциацию клеток, апоптоз, окислительный стресс, метаболизм стероидов, секрецию инсулина, сигналинг факторов роста, воспаление и иммуномодуляцию, преимущественно за счет модуляции ряда внутриклеточных сигнальных каскадов, а также постгеномной модификации белков [2].

Важно, что в последнее время выявляется высокая распространённость недостаточности и дефицита витамина D у населения всего мира, характерная для всех возрастных групп. Так, данная распространённость составляет 50% в Тайланде и Малазии, 75% в США, 74-83,2% в России, 90% в Японии и Южной Корее. Недостаточность витамина D стала представлять собой пандемию, которая затрагивает преобладающую часть общей популяции, включая детей и подростков, взрослых, беременных и кормящих женщин, женщин в менопаузе, пожилых людей. Необходимо отметить, что в последней группе при наличии остеопорозного перелома распространенность дефицита витамина D может достигать 100% [2].

Новые представления о витамине D, как о мощном стероидном гормоне, привели к существенной переоценке его физиологической роли в организме в разные периоды жизни. Доказано, что достаточный уровень D-гормона необходим на протяжении всей жизни, начиная от внутриутробного развития до самой глубокой старости [3]. Последние эпидемиологические и научные данные свидетельствуют о том, что низкий уровень витамина D, а именно уровень промежуточного метаболита 25-гидроксивитамина D (25-OH(D)), является биологическим маркером различных возраст-ассоциированных заболеваний. Интересно, что при метаанализе 18 рандомизированных клинических исследований было сделано заключение, что дополнительный прием витамина D при лечении основного заболевания снижает общую смертность [5]. В понимании того, как уровень витамина D влияет на патогенез многих заболеваний, важную роль играет тот факт, что большинство типов клеток организма синтезируют этот витамин [6,7]. Многие эксперты, включая мнение Международного эндокринологического общества (2016), считают, что дефицит витамина D определяется как уровень 25-OH(D) менее 20 нг/мл, его недостаточность – от 20 до 30 мг/мл, а оптимальный уровень – более 30 нг/мл.

Так как сердечно-сосудистые заболевания являются одной из ведущих причин смертности населения не только в России, но и во всем мире, и по прогнозам Всемирной организации здравоохранения в 2030 г. от болезней системы кровообращения умрет около 23,6 млн человек, то необходимо усиливать меры по профилактике и лечению этих заболеваний [4]. В последнее время все больше исследований показывают, что витамин D может играть определенную роль в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний. По мнению ряда авторов, низкий уровень витамина D может быть независимым фактором риска сердечно-сосудистых катастроф, а фармакологические дозы витамина D могут оказывать значимые влияния на различные факторы кардиоваскулярного риска (снижать интенсивность воспаления, улучшать эндотелиальную функцию, снижать секрецию инсулина и повышать чувствительность тканей к нему).

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-5-10

Однако результаты интервенционных исследований несколько противоречивы и не позволяют с уверенностью судить о положительном влиянии витамина D на риск возникновения и течение сердечно-сосудистых болезней и все-таки, дальнейшие исследования в этой области перспективны [5 – 8].

Среди болезней системы кровообращения артериальная гипертензия – наиболее распространенное сердечно-сосудистое заболевание. Почти треть взрослого населения всего мира страдают от этой болезни. В возникновении АГ большую роль играют нервно-эмоциональные факторы, пол, возраст, наследственность и семейная предрасположенность, а также условия труда, климатогеографические условия, избыточное питание, малоподвижный образ жизни, курение, травмы и другое [1]. Одним из ключевых звеньев патогенеза АГ является синдром системного воспаления, а витамин D является важным физиологическим медиатором, влияющим на синтез провоспалительных цитокинов, которые продуцируются нейтрофилами, активированными лимфоцитами, эндотелиальными и гладкомышечными клетками. В норме противоспалительные цитокины не должны находиться в циркулирующем русле, однако, в ряде случаев они могут появляться, указывая на наличие вялотекущих скрытых воспалительных процессов. Для цитокинов характерна способность проявлять множество биологических эффектов по отношению к различным клеткам мишени, при этом они образуют сложную сеть взаимоотношений [8 – 11]. Доказано, что у лиц со сниженным содержанием витамина D в крови была отмечена достоверная, более высокая распространенность АГ увеличенная на 30 % [3].

В настоящее время обсуждается ряд патогенетических механизмов формирования АГ у женщин. Наличие связи между концентрацией 25-гидроксивитамина D (25(OH)D) в сыворотке крови и уровнем АД установлено в результате ряда проспективных наблюдений, а именно Health Professional Follow Up Study, продемонстрировал увеличение риска АГ у женщин по сравнению с общей популяцией в 1,42 раза. Данные исследования Nurses Health Sudy показали, что исходный уровень витамина D ниже 30 нг/мл ассоциирован с повышением АД в 1,47 раза. Однако, по данным ряда исследований, подобных взаимосвязей выявлено не было [12,13].

Особое внимание уделяется женщинам в перименопаузальный период. Патогенетические механизмы, приводящие к повышению артериального давления у женщин в период перименопаузы, достаточно сложны и многофакторны, и риск развития сердечно-сосудистых заболеваний в этот период увеличивается в 2-3 раза [14].

Установлено, что наступление менопаузы характеризуется снижением уровня женских половых гормонов – эстрогенов и прогестерона, которые играют большую роль в регуляции сосудистого тонуса и АГ. Эстрогены воздействуют на имеющиеся в сосудистой стенке специфические рецепторы половых гормонов и оказывают антипролиферативное влияние на гладкомышечные клетки сосудов, тем самым подавляя секрецию коллагена этими клетками. Кроме того, эстрогенам присущи эндотелий-зависимый и эндотелий-независимый сосудорасширяющие эффекты, улучшение функции эндотелия и подавление тока кальция через потенциал-зависимые кальцивые каналы. Прогестерон также принимает участие в регуляции тонуса артериол, действуя подобно антагонистам кальция. Наряду с этим, он снижает реабсорбцию натрия вследствие антиальдостеронового действия на уровне почечных канальцев, т.е., по существу, обладает антиминералокортикоидным эффектом [13, 15].

Таким образом, наступление менопаузы, для которой характерно резкое снижение уровня эстрогенов и прогестерона, способствует развитию АГ, определяя особенности клинико-лабораторных проявлений и патогенеза заболевания у данной категории пациенток. Считается, что повышение артериального давления у женщин в постменопаузе обусловлено значительным повышением сосудистого сопротивления, о чем свидетельствует, в частности, наличие тесной положительной корреляционной связи между этими показателями. О значимости женских половых гормонов в развитии АГ говорит и такой факт. Установлено, что существует обратная корреляционная связь между уровнем прогестерона и общим периферическим сосудистым сопротивлением: чем ниже уровень прогестерона, тем выше сопротивление [13].

Кроме этого, возникающая АГ у женщин данной группы характеризуется тем, что у значительного числа пациенток повышена чувствительность к избыточному употреблению соли. Достаточно часто АГ сочетается с избыточной массой тела. Весьма характерны инсулинорезистентность периферических тканей и гиперинсулинемия, которые являются патогенетической основой метаболического сердечно-сосудистого синдрома. Кроме того, у женщин в постменопаузе, особенно при наличии АГ, более высокая распространенность гипертрофии миокарда левого желудочка по сравнению с мужчинами того же возраста. Поэтому женщины в постменопаузе относятся к группе высокого риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и осложнений [15].

Наряду со снижением уровня эстрогенов, важным звеном патогенеза АГ у женщин в данный период является активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), где ключевым регулятором её активности является ренин, который является протеолитическим ферментом и при взаимодействии с ангиотензином приводит к образованию ангиотензина I (АТ I). Последний, под воздействием ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), быстро превращается в ангиотензин II (АТ II). Физиологический эффект АТ II заключается в запуске атерогенных процессов в организме, таких, как спазм сосудов, пролиферация гладких мышечных клеток, фиброзирование тканей, всплеск свободнорадикального окисления. Следовательно, активация РААС приводит к неблагоприятным изменениям со стороны сердечно-сосудистой системы, а именно влияет на жесткость артериальной стенки, вызывая ее ригидность [15,16].

Кроме того, современные исследования показывают, что имеются данные о взаимосвязи РААС и витамина D. Установлено, что витамин D вызыва-

ет подавление активности РААС за счет торможения активности ренина, а дефицит витамина D или его недостаточность указывают на наличие влияния на механизмы развития АГ. Интересен тот факт, что подавление секреции ренина витамином D через активацию его рецепторов происходит независимо от кальциевого гомеостаза и нарушений водно-солевого обмена [9].

В отдельных научных работах установлены взаимосвязи между уровнем витамина D и цифрами артериального давления. Так, величина систолического артериального давления у пациентов свыше 140 мм рт. ст. соответствовала низким значениям (менее 17 нг/мл) сывороточной концентрации 25-OH(D). В свою очередь, существуют данные о том, что повышение концентрации витамина D в крови ведет к снижению артериального давления, так у 18 пациентов с мягкой формой АГ, получавших экспозицию ультрафиолета трёхкратно в неделю в течение 1,5 месяцев, уровень 25-OH(D) вырос на 162%, а артериальное давление снизилось на 6 мм рт.ст. [9, 12].

Так же высокая активность РААС приводит к повышенной выработке фактора некроза опухоли-α (ФНО-α), который обладает широким спектром эффектов в отношении патогенеза развития сердечно-сосудистых заболеваний. Так, по данным А.В. Наумова, при обследовании 250 пациентов с коморбидными состояниями наибольшая недостаточность витамина D наблюдалась при сочетании АГ, ишемической болезни сердца и сахарного диабета II типа, у этих же больных отмечались и высокие уровни ФНО-α, причем, при сочетании указанных болезней с заболеваниями костно-мышечной системы дегенеративного генеза отмечалось и усугубление недостаточности витамина D, и увеличение концентрации ФНО-α, что подтверждает факт, что витамин D регулирует экспрессию генов, в том числе и синтез провоспалительных цитокинов. Также сводные данные демонстрируют взаимосвязь ФНО-α и индекса окклюзии по фазам (параметр оценки эндотелиальной дисфункции) – r=0,4, *p*=0,034. Следовательно, становится очевидной взаимосвязь нарастания недостаточности витамина D в крови и тяжести эндотелиального повреждения, которое опосредуется высокой продукцией ФНО-α при нарастании недостаточности витамина D [5,15,16].

В то же время ряд исследователей указывают на наличие связи между уровнем витамина D и липидным профилем, так как тактика ведения пациентов с АГ зависит не только от значений артериального давления, но и от общего сердечно-сосудистого риска, а оценка уровня липидов крови является обязательным условием при оценке этого риска у лиц с АГ [15].

В работе R. Jorde и соавт. [17] отмечено, что высокие уровни 25-OH(D) обусловливают значительное (*p*<0,05) снижение уровней триглицеридов (ТГ) и индекса атерогенности. M.E. Miettinen и соавт. [18] установили прямую корреляционную взаимосвязь уровня 25-OH(D) с показателями липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и его апобелка (АпоА1) и отрицательную взаимосвязь с уровнями липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и ТГ. Результаты других исследований с проведением коронароангиографии показали, что уровень 25-OH(D) имел обратную корреляционную связь с уровнями общего холестерина (*p*=0,002) и ЛПНП (*p*<0,001) и ТГ (*p*=0,01), но и наличие дефицита витамина D опосредованно через нарушения липидного обмена определяло повышенный риск ишемической болезни сердца (OR=1,32, *p*=0,004), в том числе тяжелого течения данного заболевания (OR=1,18, *p*=0,05) [19].

Прием витамина D в дополнение к антигипертензивной терапии у лиц с АГ оказывает положительное влияние на уровень липидов крови, тем самым поддерживая антиатерогенный потенциал крови. Этот факт зафиксирован в ряде работ. Причем длительность приема витамина D отрицательно ассоциирована с уровнем общего холестерина и положительно – с уровнем ЛПВП, соотношением апобелка B (АпоB) к АпоA1 и их динамикой; уровень 25-OH(D) положительно ассоциирован с содержанием липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и АпоA1 и их динамикой, а уровень коэффициента атерогенности и АпоB и соотношение АпоB/АпоA1 – отрицательно. Таким образом, авторы подтвердили наличие плейотропного эффекта витамина D и возможность использования витамина D в качестве адъютивной терапии для пациентов с АГ и гиперхолестеринемией, такой эффект предположительно связан с общим метаболическим путем образования холестерина и продукцией витамина D из общего предшественника – 7-дегидрохолестерина [12].

В ряде исследований было показано, что все пациенты с гиперхолестеринемией имели в крови уровень 25-OH(D) ниже рекомендованных значений, однако значимых корреляционных связей между этими показателями не было отмечено, но в то же время была выявлена достоверная отрицательная корреляция между значениями 25-OH(D) и концентрацией ЛПНП (r=-0,3, *p*=0,04), что уже связано с значительным возрастанием сердечно-сосудистого риска [5].

Стоит обратить внимание на результаты исследований J. Oh и соавт. [20] *in vitro,* изучавших влияние ЛПНП на макрофаги лиц с сахарным диабетом 2 типа и без него в витамин D – содержащей среде. Макрофаги у пациентов с сахарным диабетом подавляли образование пенистых клеток путем снижения поглощения ЛПНП. Когда рецепторы витамина D были удалены в макрофагах лиц с диабетом, ЛПНП вызывали ускоренное формирование пенистых клеток. Это исследование открыло новый механизм, при котором витамин D, активируя свои рецепторы VDR, играет ключевую роль в снижении поглощения ся ЛПНП макрофагами и, соответственно, в развитии атеросклероза у лиц с сахарным диабетом. Регуляция витамином D синтеза ЛПВП может быть обусловлена модуляцией VDR экспрессии гена АпоA1 в гепатоцитах и энтероцитах. То есть, сигнальный путь VDR может быть потенциальной мишенью в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний.

Изучение статуса витамина D в работах В.В. Дорофейкова и соавт. показало, что с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена не было обнаружено значимых взаимных влияний между уровнем 25-OH(D) и показателями липидного спектра, но была

отмечена сила связи концентрации 25-OH(D) с уровнем мозгового натрийуретического пептида (НУП) крови (r=-0,187, *p*=0,007) [21]. Уровень НУП значимо различался в группах пациентов с дефицитом витамина D, причем его увеличение последовательно наблюдалось при переходе дефицита и далее к авитаминозу. При этом пациенты с авитаминозом в 1,9 раз более вероятно имели риск повышенного уровня НУП, нежели из группы гиповитаминоза, и в 2,6 раза по сравнению с пациентами, имеющие пониженное содержание 25-OH(D). По мнению авторов, вероятно, выраженный дефицит витамина D может нарушать минеральный состав и приводить к ослаблению сердечной мышцы, что проявляется повышением уровня НУП в крови и, следовательно, увлечением риска развития и прогрессирования хронической сердечной недостаточности.

Кроме того, необходимо отметить, что классическая роль витамина D заключается в участии в кальциево-фосфорном обмене и влиянии на минеральную плотность костной ткани. Так витамин D способствует абсорбции кальция в кишечнике и поддерживает необходимые уровни кальция и фосфора в крови для обеспечения минерализации костной ткани и предупреждения гипокальциемической титании. Известно, что увеличение фосфора в крови приводит к снижению уровня кальция в крови, стимулируя выработку паратиреоидного гормона, который, в свою очередь, увеличивает резорбцию и высвобождение фосфора и кальция из костной ткани в кровь, снижая процесс активации витамина D [4].

Доказано, что неадекватно повышенный уровень паратиреоидного гормона увеличивает риск развития АГ. Также, D-дефицит прямым и непрямым путем ведет к увеличению кальцификации сосудов, повышая сердечно-сосудистый риск. Как при первичном гиперпаратиреозе, так и при вторичном, повышенная концентрация паратгормона может способствовать повышению уровня артериального давления. Результаты некоторых исследований подтверждают гипотезу о возможном прямом влиянии паратиреоидного гормона на секрецию ренина и его немаловажную роль в патогенезе развития АГ. Однако существуют и противоположные данные. Так при исследовании эффекта паратиреоидэктомии на сердечно-сосудистый риск у пациентов с мягкой формой первичного гиперпаратиреоза, с одной стороны, не выявили достоверных различий по уровню артериального давления, с другой стороны, обнаружили повышение артериального давления после оперативного удаления паратиромы у пациентов с первичным гиперпаратиреозом и АГ [9].

В настоящее время активно изучается не только роль дефицита витамина D, но и вклад носительства полиморфных вариантов гена его рецептора в развитии патологических состояний [21]. Хорошо известно, что АГ является многофакторным полигенным заболеванием, и эндотелиальные рецепторы витамина D могут играть важную роль в регуляции эндотелиальной функции и АД. Так установлено, что некоторые полиморфизмы гена рецептора витамина D могут быть ассоциированы с ГЛЖ, атеросклерозом и АГ [22].

Кроме того, необходимо отметить тот факт, что носительство некоторых полиморфизмов гена рецептора витамина D ассоциировано со снижением биодоступности оксида азота (NO), вследствие снижения экспрессии энотелиальной NO-синтетазы, что приводит к развитию эндотелиальной дисфункции, повышению сосудистой жесткости, структурному ремоделированию аорты, а также систолической и диастолической дисфункции, независимо от активности ренин-ангиотензин-альдестероновой системы [23 – 25].

Отечественные исследования в данной области единичны и не могут в полной мере отражать истинных взаимосвязей между уровнем обеспеченности витамином D, носительством полиморфизмов гена рецептора витамина D и риском развития как АГ, так и других заболеваний сердечно-сосудистой системы в российской популяции. Однако с учетом повышения внимания к данной проблеме, вероятность получения новой информации в ближайшее время высока [25].

Обобщая имеющиеся данные, можно заключить, что оценка D-витаминного статуса при сердечно-сосудистых заболеваниях, в частности, при артериальной гипертонии, сохраняет свою актуальность. Решение данной проблемы должно быть направлено на более широкое внедрение определения уровня витамина D в клинической практике, особенно у женщин, с целью обеспечения персонализированного подхода к терапии артериальной гипертонии.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки*

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 10-11,17-24 см. REFERENCES)

1. Чазова И.Е. Артериальная гипертония в свете современных рекомендаций. *Терапевтический архив*. 2018; 9: 47.
2. Мойсеенок А.Г., Кучер А.С., Янковская Л.В., Гуринович В.А., Мойсеенок Е.А., Ровбуть Т.И. и соавт. Витамин D – расширение биохимических функций и возможности коррекции витаминного и кальциевого гомеостаза. В сборнике: Биогеохимия химических элементов и соединений в природных средах. Материалы II Международной школы-семинара для молодых исследователей, посвященной памяти профессора В.Б. Ильина. Беларусь, Минск; 2016: 109-23. https://elibrary.ru/item.asp?id=32343558
3. Калинченко С.Ю., Жиленко М.И., Д.А. Гусакова и соавт. Витамин D и репродуктивное здоровье женщин. *Проблемы репродукции*. 2016; 4: 28-31.
4. Акасов Р. Оценка, профилактика и лечение дефицита витамина D: рекомендации для клинической практики. *Лабораторная медицина.* 2013; 13: 94-6.
5. Наумов А.В. Гормон D3 как витамин для коморбидных состояний: кому, когда и как? *Трудный пациент*. 2018; 16(3): 20-8.
6. Плудовски П., Карчмаревич Э., Бфйер М. и соавт. Практические рекомендации по поступлениюе витамина D и лечение его дефицита в Центральной Европе – рекомендуемое потребление витамина D среди населения в целом и в группах риска по дефициту витамина D. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* 2014; 2: 109-18.
7. Рунова Г.Е., Теряева Н.Б., Фадеев В.В., Стериополо Н.А. Нерешенные вопросы при оценке статуса витамина D. *Лабораторная служба*. 2017; 6 (3): 113.
8. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Индивидуальная профилактика сердечно-сосудистых заболеваний. Позиция европейских кардиологических обществ. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2017; 6(1): 4-7.

9. Дудинская Е.Н., Ткачева О.Н. Роль витамина D в развитии артериальной гипертензии. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2012; 11 (3): 77-82.
12. Кежун Л.В., Янковская Л.В., Ляликов С.А., Курбат М.Н. Суточный профиль артериального давления при восполнении дефицита/недостаточности витамина D у женщин с артериальной гипертензией в раннем постменопаузальном периоде. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* 2014; 3: 112-6.
13. Майчук Е.Ю., Юренева С.В., Печенкина И.В., Мартынов В.И. Особенности формирования артериальной гипертонии у женщин в постменопаузе. *Российский медицинский журнал*. 2003; 9: 540.
14. Лопатина О.В., Балан В.Е., Ткачева О.Н. и соавт. Факторы женского здоровья с точки зрения репродуктивной системы и риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. *Альманах клинической медицины*. 2015; 37: 111-7.
15. Авдеева К.С., Петелина Т.И., Гапон Л.И., Мусихина Н.А., Зуева Е.В. Особенности артериальной гипертонии у женщин с абдоминальным ожирением в постменопаузе: роль маркеров воспалительной реакции, лептина и женских половых гормонов в патогенезе регидности сосудистой стенки. *Сибирский медицинский журнал.* 2019; 3 (34) :103-13.
16. Кежун Л.В., Янковская Л.В. Роль ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и витамина D в развитии артериальной гипертензии у женщин в перименопаузальном периоде (обзор литературы). *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2013;1:14-7.
21. Дорофейков В.В., Иванов В.И., Кайстря И.В. Статус витамина D у пожилых жителей и спортсменов в Северо-западном регионе России. *Лабораторная служба*. 2017; 6(13): 113.
25. Каронова Т.Л., Андреева А.Т., Злотникова Е.К., Гринева Е.Н. Недостаточность витамина D и артериальная гипертензия: что общего? *Артериальная гипертензия*. 2017; 23 (4): 275-81.

REFERENCES

1. Chazova I.E. Hypertension in the light of current recommendations. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2018; 9: 47. (in Russian)
2. Moiseenok A.G., Kucher A.S., Yankovskaya L.V. Gurinovich V.A., Moyseenok E.A., Rovbut T.I. et al. Vitamin D – expansion of biochemical functions and the possibility of correction of vitamin and calcium homeostasis . *Biogeochemistry of chemical elements and compounds in the natural environment: materials of the II international school-seminar for young researchers*. Belarus. Minsk. 2016: 102-23. https://elibrary.ru/item.asp?id=32343558
3. Kalinchenko S.Yu., Zhilenko M.I., Gusakova D.A. et al. Vitamin D and women's reproductive health. *Problemy reproduktsii*. 2016; 4: 28-31. (in Russian)
4. Akasov R. Evaluation, prevention and treatment of vitamin D deficiency: recommendations for clinical practice. *Laboratornay meditsina*. 2013;13: 94-6. (in Russian)
5. Naumov A.V. Hormone D3 as a vitamin for comorbid conditions: to whom, when and how? *Trudnyi patient.* 2018;16 (3): 20-8. (in Russian)
6. Pludowski P., Karchmarevich H., Bfier M., et al. Practical recommendations on the intake of vitamin D and the treatment of its deficiency in Central Europe – the recommended intake of vitamin D among the general population and in groups at risk of vitamin D deficiency. *Journal Grodninskogo gosudarstvennogo medicinskogo Universiteta.* 2014; 2: 109-18.
7. Runova G.E., Teryayeva N.B., Fadeev V.V., Steriopolo N.A. Unsolved issues in assessing the status of vitamin D. *Labarotoray Sluzhba*. 2017; 6(3): 113. (in Russian)
8. Oganov R.G., Maslennikova G.Ya. Individual prevention of cardiovascular diseases.The position of the European cardiological societies.*Kardiovaskulyarnaya therapiya i profilaktika.* 2017;16 (1): 4-7. (in Russian)
9. Dudinskaya E.N., Tkacheva O.N. The role of vitamin D in the development of arterial hypertensionю. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika.* 2012; 11 (3): 77-82. (in Russian)
10. Norman P.E., Powell J.T. Vitamin D and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2014;114: 379-93.
11. Lin Z., Li W. The roles of vitamin D and its analogs in inflammatory diseases. *Curr. Top. Med. Chem*. 2016;114:1242-61.
12. Kezhun L.V., Yankovskaya L.V. The role of the renin-angiotene-aldosterone system and vitamin D in the development of arterial hypertension in women in the perimenopausal period (literature review). *Journal Grodninskogo gosudarstvennogo meditsinskogo Universiteta.* 2013;1: 14-7.
13. Maychuk E.Yu., Yureneva S.V., Pechenkina I.V., Martynov V.I. Features of the formation of arterial hypertension in postmenopausal women. *Russkiy Meditsinckyi Zhurnal.* 2003; 9: 540. (in Russian)
14. Lopatina OV, Balan V.E., Tkacheva O.N. et al. Factors of female health in terms of the reproductive system and the risk of developing cardiovascular diseases. *Almanakh Klinicheskoy Meditsiny*. 2015; 37: 111-7. (in Russian)
15. Avdeeva K.S., Petelina T.I., Gapon L.I., Musikhina N. A,. Zyeva E.V. Features of arterial hypertension in women with abdominal obesity in postmenopausal women: the role of markers of the inflammatory reaction, leptin and female sex hormones in the pathogenesis of vascular wall regidity. *Sibirskyi Meditsinskyi Zhurnal.* 2019; 3 (34): 103-13. (in Russian)
16. Kezhun L.V., Yankovskaya L.V., Lyalikov S.A., Kurbat M.N. Daily blood pressure profile in replenishing vitamin D deficiency / deficiency in women with arterial hypertension in the early postmenopausal period. *Journal Grodninskogo gosudarstvennogo meditsinskogo Universiteta.* 2014; 3: 112-6.
17. Jorde R., Hutchinson Y., Emaus N., Grimnes G. High serum 25-OH vitamin D concentrations are associated with a favorable serum lipid profile. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2012;64(12): 1457-64.
18. Miettinen M.E., Kinnunen L., Leiviska J., Keinanen-Kiukaanniemi S., Korpi-Hyovalti E., Oksa Y. et al. Association of serum 25-OH vitamin D with lifestyle factors and metabolic and cardiovascular disease markers: populations-based cross-sectional study (FinD2D). *PLoS One*. 2014; 9(7): e1000235.
19. Verdoia M., Schaffer A., Sartori C., Barbieri L., Cassetti E., Marino P. et al. Vitamin D deficiency is independently associated with the coronary artery disease. *Eur. J. Clin. Invest*. 2014; 44(7): 634-42.
20. Oh J., Weng S, Felton S.K., Bhandare S., Riek A., Batler B., Proctor B.M., et al. 25 (OH)2 vitamin D inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2009;120: 687-98.
21. Dorofeikov V.V., Ivanov V.I., Kaistrya I.V. Vitamin D status in elderly residents and athletes in the North-West region of Россия. *Labarotoray Sluzhba* . 2017; 6(13): 113. (in Russian)
22. Dilmec F., Uzer E., Akkafa F., Kose E. Genetics and biology of vitamin D reseptor polymorphism. *Gene.*2004;338(2):143-56.
23. Solak Y., Covic A., Kanbay M. What do we know and do not know about vitamin D. A causal association between vitamin D reseptor genetic polymorhism and hypertension. *J.Clin Hypertens*.2014;16(9): 627-8.
24. Andrukhova O., Slavic S., Zeitz U., Riesen S.C., Heppelmann M.S. Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Mol. Endocrinol*.2014;28(1): 53-64.
25. Karonova T.L., Andreeva A.T., Zlotnikova E.K., Grineva E.N. Vitamin D deficiency and hypertension what is in common? *Arterial´naya Gypertenziya.* 2017; 23(4): 275-81. (in Russian)

Поступила 21.10.19
Принята к печати20.11.19

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Иванов В.И.[1], Дорофейков В.В.[2], Кайстря И.В.[1], Эмануэль В.Л.[3]

ВИТАМИН D И ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОГО РИСКА У ПОЖИЛЫХ

[1] Клиника «Современные медицинские технологии», 190013, Санкт-Петербург, Россия;
[2] НГУ физической культуры, спорта и здоровья им. П.Ф. Лесгафта, 190121, Санкт-Петербург, Россия;
[3]ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022 , Санкт-Петербург, Россия

Целью настоящей работы было изучение обеспеченности витамином D в популяции свободно живущих пожилых жителей Санкт-Петербурга и его связи с лабораторными показателями риска сердечно-сосудистых осложнений. В зимний период были обследованы 209 добровольцев, не принимавших препараты витамина D в течение предыдущих 6 месяцев, из них 152 женщины и 57 мужчин в возрасте от 71 до 91 года. У всех обследованных концентрация D(OH) в сыворотке крови была ниже 30 нг/мл (анализатор и реактивы «Architect i1000SR, Abbott»). Не обнаружено значимых взаимных влияний между уровнем 25(OH)D и показателями липидного спектра, гликированного гемоглобина $A1_c$, тестостерона, ультрачувствительного С-реактивного белка. Теснота связи концентрации витамина D(OH) с уровнем мозгового натрийуретического пептида (BNP) характеризовалась r_s=0,187 (p=0,007). У пожилых лиц с тяжелым дефицитом витамина (менее 10 нг/мл) риск повышенного уровня BNP был в 2,6 раза выше, чем в группе с пониженным уровнем витамина (20-30 нг/мл).

Ключевые слова: *витамин D; мозговой натрийуретический пептид; сердечно-сосудистый риск; пожилые лица.*

Для цитирования*: Иванов В.И., Дорофейков В.В., Кайстря И.В., Эмануэль В.Л. Витамин D и лабораторный показатели сердечно-сосудистого риска у пожилых. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1): 11-15.*

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-11-15

Ivanov V.I.[1], Dorofeykov V.V.[2], Kaystrya I.V.[1], Emanuel V.L.[3]

VITAMIN D AND LABORATORY INDICATORS OF CARDIOVASCULAR RISK IN THE ELDERLY

[1] Clinic "Modern medical technologies», 190013, St.Petersburg, Russia;

[2] Lesgaft National State University of Physical Education, Sport and Health, 190121, St.Petersburg, Russia;

[3] Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 197022, St.Petersburg, Russia

The aim of this work was to study the availability of vitamin D in the population of free living elderly people in St. Petersburg and its relationship with laboratory indicators of the risk of cardiovascular complications. In winter were surveyed 209 volunteers who did not take vitamin D during the previous 6 months, with 152 women and 57 men aged 71 to 91 years. In all the examined patients the concentration of D(OH) in serum was below 30 ng/ml (analyzer and reagents «Architect i1000SR, Abbott»). No significant mutual effects were found between level 25(OH)D and lipid spectrum, hemoglobin $A1_c$, testosterone, ultra-sensitive C-reactive protein. The close relationship between vitamin D(OH) concentration and brain natriuretic peptide (BNP) levels was characterized by rs=0.187 (p=0.007). In older people with severe vitamin deficiency (less than 10 ng/ml), the risk of elevated BNP levels was 2.6 times higher than in those with reduced vitamin levels (20-30 ng/ml).

Keywords: *vitamin D; brain natriuretic peptide; cardiovascular risk; older persons.*

For citation: *Ivanov V.I., Dorofeykov V.V., Kaystrya I.V., Emanuel V.L. Vitamin D and laboratory indicators of cardiovascular risk in the elderly. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).2020; 65 (1): 11-15 (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-11-15*

For correspondence: *Dorofeykov V.V.,* MD, Professor, head of the Department of biochemistry; e-mail: Vdorofeykov@ya.ru

Information about authors:

Dorofeykov V.V., https://orcid.org/0000-0002-7272-1654

Emanuel V.L., https://orcid.org/0000-0002-2079-0439

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 23.11.2019
Accepted 02.12.2019

В последние годы появились многочисленные данные о важной роли витамина D в области охраны здоровья. В дополнение к его принципиальной функции, как эндокринного регулятора всасывания и метаболизма кальция, недавние исследования выявили существенную связь между уровнем витамина D и развитием многих распространенных заболеваний, включая сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), рак, психические расстройства и аутоиммунные нарушения [1,2]. О возможной протективной роли витамина D при сердечно-сосудистых заболеваниях свидетельствуют данные об обратной корреляции между его уровнем и кальцификацией коронарных сосудов

Для корреспонденции: *Дорофейков Владимир Владимирович*, д-р мед.наук, проф., зав. каф. биохимии; e-mail: Vdorofeykov@ya.ru

[3], типичного осложнения, распространенность и гистоанатомический тип которого являются предикторами последующей сердечно-сосудистой летальности [4]. Кроме того, дефицит витамина D индуцирует гипертрофию миокарда и повышает продукцию внутриклеточного матрикса в его ткани [5], способствует атерогенным изменениям липидного профиля, повышает риск развития сердечных осложнений через нарушения углеводного обмена, активацию артериальной гипертензии, метаболического синдрома [6].

Биологическое воздействие витамина D обеспечивается связыванием его активной формы кальцитриола [1,25-$(OH)_2$D] с внутриклеточными рецепторами VDR клеток-мишеней [7]. Тот факт, что VDR экспрессируются в клетках всей сосудистой системы свидетельствует о непосредственном участии метаболитов витамина D в патогенезе ССЗ. Кроме того, гладкомышечные клетки сосудов, эндотелиальные клетки и кардиомиоциты способны вырабатывать энзим 1-α-гидроксилазу при посредстве которой 25-гидроксивитамин D [кальцидиол, 25(OH)D] трансформируется в активный кальцитриол, и тем самым осуществляет собственные регуляторные механизмы, не связанные с обменом кальция [8].

Считается, что в мире насчитывается более 1 миллиарда человек, имеющих недостаток или дефицит витамина D [9]. Однако, отсутствие единых критериев диагностики и стандартизованных методов оценки дефицита витамина D приводят к большому разбросу данных. Наиболее универсальным и адекватным лабораторным показателем статуса витамина D считается уровень 25(OH)D в сыворотке крови [10]. Его концентрация в крови в 1000 раз превышает содержание активного метаболита 1,25$(OH)_2$D, а период полураспада составляет 2-3 нед против 4 ч для кальцитриола [11]. При этом, кальцидиол отражает как образование витамина D в коже, так и его поступление с пищей [12], то есть является показателем его запасов в организме.

Россия в силу своего географического положения находится в зоне низкой инсоляции, поэтому все ее жители входят в группу риска дефицита витамина D. Вместе с тем, только единичные исследования свидетельствуют об уровне обеспеченности витамином D населения в отдельных регионах Российской Федерации. Поэтому проведение исследований в этой области является актуальной задачей отечественного здравоохранения.

Целью настоящей работы было изучение статуса витамина D в популяции свободно живущих пожилых жителей Санкт-Петербурга и его связи с лабораторными показателями риска сердечно-сосудистых осложнений. Исследование выполнялось в рамках эпидемиологического изучения пожилых лиц из неорганизованной популяции – проекта «Хрусталь» на базе клинико-диагностической лаборатории клиники «Современные медицинские технологии», Санкт-Петербург.

Материал и методы. В зимний период (февраль-март) были обследованы 209 добровольцев, не принимавших препараты витамина D в течение предыдущих 6 месяцев. 72,7 % выборки (152/209) составляли женщины, 27,3 % (57/209) – мужчины. При включении в исследование возраст пациентов варьировал от 71 до 91 года с медианой (интерквартильной широтой), равной 77 годам (от 74 лет до 81 года). Взятие крови при визите для определения сывороточных уровней общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицеридов (ТГ), биохимических, гормональных показателей, концентрации 25(OH)D, плазменного уровня мозгового натрийуретического пептида (МНП) проводили натощак, после 12 часов голодания. Венепункцию выполняли в положении сидя, без наложения жгута, с помощью соответствующих вакуумных систем фирмы «Sarstedt» (Германия). Все показатели исследовали не позднее 1 ч от момента забора крови на соответствующих анализаторах: биохимическом «ARCHITECT c4000», иммуноферментном «ARCHITECT i1000SR» (по методике CMIA) с использованием штатных наборов реагентов, калибраторов и контролей фирмы «Abbott» (США). Уровень холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП) рассчитывали по формуле Фридвальда с соблюдением условия, что концентрация триглицеридов была менее 4,52 ммоль/л:

ХС ЛПНП = ОХС – ХС ЛПВП – ТГ/2,18 (ммоль/л).

Статистический анализ данных выполняли с помощью статистического пакета IBM SPSS 22, Чикаго, США. Решение о соответствии результатов анализов по различным показателям нормальному закону распределения принималось нами на основе оценки критерия Колмогорова-Смирнова в модификации Лиллиефорса, W-теста Шапиро-Уилка, критерия G^2 Смирнова-Крамера-фон Мозеса [13], критерия равенства дисперсий Ливена и теста однородности дисперсий Брауна-Форсайта. Дополнительно проводили визуальную оценку P-P графиков, безтрендовых Q-Q графиков, коробчатых графиков на выбросы и ассиметрию. Изучение статистических закономерностей в выборках, где распределение количественных признаков было признано нормальным, осуществляли с применением параметрических критериев. В противном случае использовали непараметрические методы (критерий Манна-Уитни, дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с медианным тестом, ранговая корреляция Спирмана). Для оценки вероятности рисков использовали расчет относительного риска в когорте. Отношение инцидентностей считали значимым, если в границы его 95 % доверительного интервала не попадала 1. Различия во всех случаях оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты. В таблице (*а, б*) приведены сводные статистические показатели полученных нами данных. В связи с важностью проверки исследуемых переменных на нормальность, что является безусловной частью разведочного анализа данных, мы разделили таблицу на 2 части (*а* и *б*) – в соответствии с близостью или расхождением распределений результатов лабораторных анализов относительно нормального закона.

Как видно из таблицы *(а)* уровень сывороточного 25-гидроксивитамина D у пациентов в нашем исследовании варьировал от 5,0 до 28,0 нг/мл, при следующих

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-11-15

Основные характеристики показателей лабораторных исследований

***а)* гипотеза о нормальном распределении переменных отвергнута**

Переменные	N	Me	Квартили		Межквартильный размах (Q_3-Q_1)
			Q_1	Q_3	
Общий белок (г/л)	209	73,90	70,85	77,10	6,25
Креатинин (мкмоль/л)	209	69,02	62,57	80,69	18,12
Триглицериды (ммоль/л)	209	1,37	0,99	1,82	0,83
Индекс атерогенности (по А.Н. Климову)	209	3,20	2,60	4,00	1,40
Атерогенный индекс плазмы (AIP)	209	0,018	-0,20	0,19	0,39
С-реактивный белок (CRP) (нг/мл)	209	1,89	1,04	3,93	2,89
Гликозилированный гемоглобин (H_bA1_c) (%)	209	5,64	5,44	5,80	0,36
Тиреотропный гормон (ТТГ) (мМЕ/л)	209	2,12	1,38	3,53	2,15
Мозговой натрийуретический пептид (МНП) (пг/мл)	209	61,70	40,50	104,05	63,55
Кальцидиол [25(OH)D]нг/мл	209	15,50	12,79	19,70	6,91

Примечание. Me-медиана ряда.

***б)* гипотеза о нормальном распределении переменных принята**

Переменные	N	$\bar{X}$ (SD)
Общий холестерин (ммоль/л)	209	5,74 (1,14)
ХС ЛПНП (ммоль/л)	209	3,66 (1,04)
ХС ЛПВП (ммоль/л)	209	1,37 (0,32)
Альбумин (г/л)	209	40,60 (1,58)
Общий тестостерон (мкг/л)	57	15,12 (6,82)

Примечание. $\bar{X}$ (SD) – среднее (ст. отклонение).

устойчивых показателях распределения: медиана 15,5 нг/мл (25-й процентиль = 12,8 нг/мл, 75-й процентиль = 19,7 нг/мл). Таким образом, интерквартильный диапазон в 6,9 нг/мл оценивает разброс показателей 25(OH)D у 50 % пациентов, четверть испытуемых имели уровень менее 12,8 нг/мл и четверть – более 19,7 нг/мл. Рассчитанный нами непараметрический медианный доверительный интервал, рекомендуемый для практического использования [14], позволяет утверждать, что медиана витамина D популяционной совокупности пожилых жителей Санкт-Петербурга с доверительной вероятностью 0,95 будет находиться в пределах от 14,9 до 16,8 нг/мл.

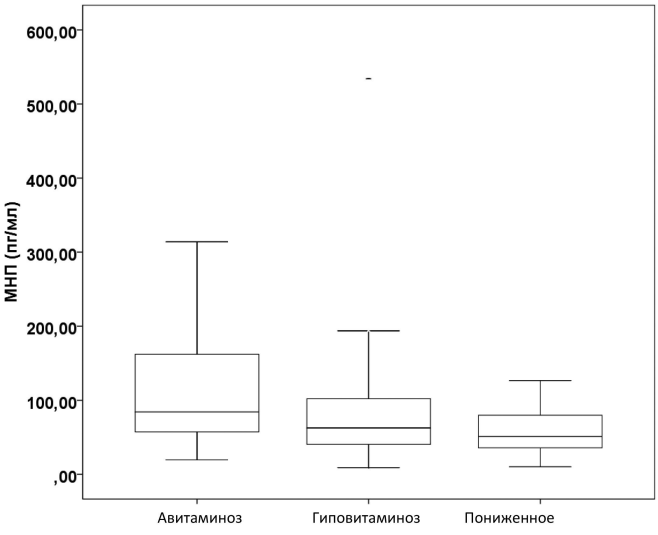
Различий в обеспеченности витамином D по полу нами не выявлено: средний уровень 25(OH)D в крови женщин (Me=15,45 нг/мл) мало отличается от его уровня у мужчин (Me=16,83 нг/мл), что подтверждается результатом расчета критерия Манна-Уитни (U=3838.5, Z=−1.267, p=0.205), позволяющего констатировать отсутствие статистически достоверных гендерных отличий.

В настоящее время нет общепризнанных количественных критериев дефицита витамина D. В своей работе мы придерживались терминологии, которая использовалась в СССР и применяется в РФ применительно к другим витаминам. Так, сывороточную концентрацию 25(OH)D ниже 10 мг/мл расценивали как авитаминоз (в некоторых работах обозначен как тяжелый дефицит), диапазон от 10 до 20 мг/мл включительно, рассматривали как гиповитаминоз (дефицит), от 21 до 30 мг/мл как пониженный уровень витамина D в организме. Нормальным диапазоном концентрации кальцидиола считали уровень от 30 до 100 нг/мл (при значениях более 100 нг/мл возможен токсический эффект, однако такие пациенты в нашей лаборатории не встречались за 5 лет определения уровней витамина D(OH) более, чем в 5000 образцов крови). Таким образом, в соответствии с этой классификацией пациенты нашей выборки были разделены на 3 группы:

- группа авитаминоза – 9,6 % всех образцов (20/209);
- группа гиповитаминоза – 66,0 % (138/209);
- группа пониженного содержания витамина – 24,4 % (51/209).

Обследованных с уровнем витамина D более 30 нг/мл в нашей выборке не наблюдалось.

Полученные группы были протестированы с помощью рангового анализа вариаций по Краскелу-Уоллису с медианным тестом на предмет различий в них уровней мозгового натрийуретического пептида (МНП). Результаты расчетов (p=0,003) выявили высоко значимые отличия средних оценок. Медианный критерий (χ^2=14,207, p=0,001) также значим и под-



Взаимосвязь плазменной концентрации недостаточности витамина D(OH) в сыворотке крови.

твердил сделанный вывод. Выполненная оценка статистики критерия Джонкхиера-Терпстры (p=0,002) позволяет утверждать, что медианы МНП возрастают при переходе от группы к группе, осуществляемом в направлении уменьшения уровня витамина D(OH). Графическое представление результатов показано на рисунке.

Средний уровень МНП последовательно понижается от группы пациентов с авитаминозом к категории пониженного содержания витамина D. Попарные сравнения с помощью критерия Манна-Уитни выявили значимые различия уровней МНП между группами пациентов с авитаминозом и гиповитаминозом (U=857,5, Z=−2,732, p=0.006), авитаминозом и пониженного содержания витамина D (U= 258,0, Z= −3,221, p=0.001). В случае сравнения групп гиповитаминоз – пониженное содержание граница значимости по результатам двухвыборочного критерия Колмогорова-Смирнова была преодолена незначительно (Z=1,290, p=0,072) и наблюдалась тенденция к проявленной закономерности.

Аналогичный анализ методом контрастов (равенство дисперсий не предполагалось) показал статистически значимые различия во всех парах сравнения (T=-2,099, p=0,032; T=-2,910, p=0,008; T=-2,086, p=0,036, соответственно). Приведение показателей МНП к дихотомическому виду с точкой деления более 100 пг/мл (граница нормы) и последующий расчёт относительного риска (OR) между группами показал, что у пациентов с авитаминозом риск повышенного уровня МНП в 1,9 раза вероятней, чем в группе гиповитаминоза (95 % ДИ 1,14-3,23) и в 2,6 раза выше, чем в группе с пониженным уровнем витамина D(OH) (95 % ДИ 1,26-5,18). При переходе от группы гиповитаминоз к группе пониженного содержания OR=1,33, но 95 % ДИ (0,71-2,48) содержит 1, т.е. результат не является статистически значимым. Однако, ширина интервала даёт чёткое представление о том, какие значения относительный риск может принимать в 95 % случаев, что не позволяет отнести его к маловажным. Мы не обнаружили с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмана значимых взаимных влияний между уровнем 25(OH)D и показателями липидного спектра, атерогенного индекса плазмы, гликированного гемоглобина $HbA1_c$, эстрадиола, тестостерона, ультрачувствительного С-реактивного белка, показатели без сомнения связанные с развитием атеросклероза [15]. Теснота связи концентрации витамина D(OH) с уровнем мозгового натрийуретического пептида характеризовалась r_s=0,187 (p=0,007).

Обсуждение. Дефицит витамина D отражает глобальную ситуацию в связи с его широким и повсеместным распространением в различных популяциях. Так, от 40 до 100 процентов пожилых людей США и Европы, живущих в обычных условиях, имеют недостаточность витамина D [16]. Неадекватный витаминный статус связывают с риском развития нескелетных патологий, в частности, сердечно-сосудистых заболеваний [17]. Полученные нами средние оценки уровня кальцидиола в сыворотке пожилых жителей Северо-Западного региона РФ (Me=15,5 нг/мл) мало отличались от аналогичных показателей у японских мужчин в возрасте 40-79 лет (14,5 нг/мл) [18] и итальянских здоровых подростков 10-21 года (20 нг/мл) [19]. Даже в солнечной Индии средний уровень витамина D в выборке солдат, обследованных зимой, составил 18,8 нг/мл [20]. Близки и процентные соотношения распределения обследованных по группам дефицита витамина D: авитаминоз имели 9,6 % пациентов нашей выборки и 8,9 % итальянских подростков, гиповитаминоз – 66,0 % и 49,9 %, пониженное содержание – 24,4 % и 32,3 % соответственно.

В исследованиях последних лет показана важная прогностическая роль мозгового натрийуретического пептида в развитии неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных с сердечной недостаточностью [21]. По данным ряда авторов уровень МНП возрастает пропорционально тяжести дисфункции миокарда [22]. Основным стимулом секреции МНП является повышение напряжения миокарда при увеличении давления в левом желудочке сердца [23].

В нашем исследовании уровень МНП значимо различался в группах дефицита витамина D, причем его увеличение последовательно наблюдалось при переходе от категории пониженного содержания к группе гиповитаминоза и далее к авитаминозу. При этом пациенты с авитаминозом в 1,9 раза (или на 90 %) более вероятно имели риск повышенного статуса МНП (более 100 пг/мл), нежели из группы гиповитаминоза, и в 2,6 раза (или на 160 %) по сравнению с пациентами, имеющими пониженное содержание 25(OH)D. Вероятно, выраженный дефицит витамина D может нарушать минеральный состав и приводить к ослаблению сердечной мышцы, что проявляется повышением уровня МНП и, следовательно, увеличением риска развития и прогрессирования хронической сердечной недостаточности. Расчет NNT (числа пациентов, которых необходимо лечить) показал, что для предотвращения одного случая повышенного уровня МНП в группе авитаминоза, необходимо провести лечение и перевести 4 пациентов (NNT=4,18) в группу гиповитаминоза, или 3 пациентов (NNT=3,29) в категорию пониженного содержания. Полученные оценки свидетельствуют о том, что потенциальный эффект от профилактических мер, направленных на коррекцию недостаточности витамина D, весьма велик.

Таким образом, лечение или недопущение развития дефицита витамина D является важной профилактической и лечебной задачей здравоохранения, имеющей серьезные медицинские и социальные последствия, особенно при большой вероятности дефицита витамина у большинства населения РФ. Необходимы новые исследования по выяснению роли витамин D-дефицитных состояний как причинного и обратимого фактора широкого спектра патологических состояний.

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

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-4, 6-8, 13-15, 17-22 см. REFERENCES)

1. Белов А.Г. Непараметрический медианный доверительный интервал. Проблемы развития науки и образования: Теория и практика. Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции. Часть 1. М.: АР-Консалт; 2015: 7-10.
5. Дорофейков В.В., Ситникова М.Ю., Лелявина Т.А., Паскарь Н.С., Сухова И.В., Федотов П.А., Иванов В.И., Кунина О.И., Шабанова Г.Р. Мозговой натрийуретический пептид в кардиологии и кардиохирургии. *Медицинский алфавит*. 2014; 1(3): 49-56.
9. Орлов А.И. Новая парадигма прикладной статистики. Статистика и прикладные исследования. Сборник трудов Всероссийской научной конференции. Краснодар: Изд. КубГАУ; 2011: 206-17.
10. Петрова Н.Н., Дорофейков В.В., Варзин С.А. Витамин D: новые знания и новые возможности для сохранения здоровья и улучшения спортивных результатов. *Теория и практика физической культуры*. 2016; 11: 32-4.
11. Шварц Г.Я. Дефицит витамина D и его фармакологическая коррекция. *Русский медицинский журнал.* 2009; 17(7): 477-86.
12. Шилин Д.Е. Витамин-гормон D в клинике XXI века. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2010; 12: 17-23.
16. Титов В.Н., Котловский М.Ю., Покровский А.А., Котловская О.С., Оседко А.В., Оседко О.Я., Титова Н.М., Котловский Ю.В., Дыгай А.М. Спирт холестерин, биологическая роль на ступенях филогенеза, механизмы ингибирования синтеза стерола статинами, факторы фармакогеномики и диагностическое значение холестерина липопротеинов низкой плотности. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2015; 60(4): 4-13.
23. Задорожная М.С., Дорофейков В.В., Петрова Н.Н. Депрессии молодого возраста и витамин D(OH) крови. *Психическое здоровье*. 2017; 15(8): 19-26.

REFERENCES

1. Belov A. G. Nonparametric estimation of the median confidence interval. Problems of development of science and education: Theory and practice. Collection of scientific papers on materials Between scientific practice Conference. Part 1. [Sbornik nauchnykh trudov po materialam Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii]. Moscow: AP-Consult; 2015: 7-10. (in Russian)
2. Bischoff-Ferrari, H.A., P. Burckhardt, K. Quack-Loetscher, B. Gerber, D. I'Allemand, J. Laimbacher, M. Bachmann, and R. Rizzoli. Vitamin D deficiency: Evidence, safety, and recommendations for the Swiss population. Report written by a group of experts on behalf of the Federal Commission for Nutrition (FCN) 2012. http://www.iccidd.org/p142000804.html.
3. Cavalier E. Vitamin D: current status and perspectives. *Clin. Chem. Lab. Med*. 2009; 47(2):120-7.
4. Clerico A., Iervasi G., Mariani G. Pathophysiologic relevance of measuring the plasma levels of cardiac natriuretic peptide honnones in hymans. *Horm. Metab. Res*. 1999; 31(9): 487–9.
5. Dorofeykov V.V., Sitnikova M.Ju., Leljavina T.A., Paskar' N.S., Suhova I.V., Fedotov P.A., Ivanov V.I., Kunina O.I., Shabanova G.R. Brain natriuretic peptide in cardiology and cardiac surgery. *Meditsinskiy alfavit*. 2014; 1(3): 49-56. (in Russian)
6. Holick M.F. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357: 266–81.
7. Holick M.F. High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health *Mayo. Clin. Proc. March.* 2006; 81(3): 353-73.
8. London G.M., Guerin A.P., Marchais S. et al. Arterial media calcification in end-stage renal disease: Impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol. Dial Transplant.* 2003; 18: 1731–40.
9. Orlov A. I. New paradigm of applied statistics. Stat. and PM. research.: Proceedings of the all-Russian scientific conference. Krasnodar: KubGAU, 2011: 206-17. (in Russian)
10. Petrova N. N., Dorofeikov V. V., Varzin S. A. Vitamin D: new knowledge and new opportunities for health preservation and sports results improvement. *Teoriya i praktika fizicheskoy kul'tury.* 2016; 11: 32-4 (in Russian)
11. Shvarts G.Ya. Vitamin D Deficiency and its pharmacological correction. *Russkiy meditsinskij zhurnal.* 2009; 17(7): 477-86. (in Russian)
12. Shilin D. E. Vitamin-hormone D in the clinic of the XXI century. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2010; 12: 17-23. (in Russian)
13. Simpson R.U., Hershey S.H., Nibbelink K.A. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2007; 103: 521–4.
14. Souberbielle J.C. Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. *Joint Bone Spine*. 2006; 73: 249-53.
15. Sun X., Cao Z.B., Tanisawa K., Ito T., Oshima S., Higuchi M. The relationship between serum 25-hydroxyvitamin D concentration, cardiorespiratory fitness, and insulin resistance in Japanese men. *Nutrients.* 2014; 29: 91-102.
16. Titov V.N., Kotlovskiy M.Yu., Pokrovskiy A.A., Kotlovskaya O.S., Osedko A.V., Osedko O.Ya., Titova N.M., Kotlovskiy Yu.V., Dygaj A.M. Alcohol cholesterol, biological role, on the steps of phylogenesis, the mechanisms of inhibition of Sterol synthesis of statins, factors pharmacogenomics and diagnostic value of cholesterol low-density lipoprotein. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(4): 4-13. (in Russian)
17. Trang H. Evidence that vitamin D3 increasses serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently that does vitamin D2. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; 68: 854-8.
18. Vierucci F, Del Pistoia M, Fanos M, Erba P, Saggese G. Prevalence of hypovitaminosis D and predictors of vitamin D status in Italian healthy adolescents. *Ital. J .Pediatr.* 2014; 5: 40-54.
19. Wacker M., Holick M.F. Sunlight and Vitamin D. A global perspective for health. *Dermato-Endocrinology*. 2013; 5: 51–108.
20. Wang T.J., Pencina M.J., Both S.L. et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 2008; 117: 503–11.
21. Watson K.E., Abrolat M.L., Malone L.L. et al. Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation.* 1997; 96:1755-60.
22. Yoshimura M., Yasue H., Okumura M. et al. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1993; 87: 464–9.
23. Zadorozhnaya M. S., Dorofeykov V. V., Petrova N. N. Young age depression and blood vitamin D(OH). *Psikhicheskoe zdorov'e*. 2017; 15(8): 19-26. (in Russian)

Поступила 23.11.19
Принята к печати 02.12.19

RUSSIAN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS. 2020; 65(1)
DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-16-23

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Шпилевая М. В.[1], Рунина А. В.[1], Филиппова М.А.[2], Кубанов А. А.[1]

СРАВНЕНИЕ ИММУНОЧИПОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ СИФИЛИСА, ВЫПОЛНЕННЫХ ПО ТЕХНОЛОГИИ СОПОЛИМЕРИЗАЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ И МЕТОДОМ БЕСКОНТАКТНОЙ ПЕЧАТИ

[1]ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России, 107076, Москва, Россия;
[2]ФГБУ Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, Россия

Цель работы – исследовать характеристики иммуночипов, изготовленных по технологии сополимеризационной иммобилизации и методом бесконтактной печати, для расширения возможностей диагностики сифилиса. На примере решения ряда диагностических задач показано, что оба вида иммуночипов позволяют с высокой специфичностью и чувствительностью проводить скрининг на сифилис и обеспечивают возможность вероятностной дифференциацией разных форм данного заболевания. В статье описаны преимущества и недостатки метода бесконтактной печати, результаты проведенного анализа и проблемы, которые предстоит решить для повышения точности исследований с применением данной методики.

Ключевые слова: *иммуночип; микрочип; серологические тесты; рекомбинантные антигены; T. pallidum.*

Для цитирования: *Шпилевая М.В., Рунина А.В., Филиппова М.А., Кубанов А.А. Сравнение иммуночипов для диагностики сифилиса, выполненных по технологии сополимеризационной иммобилизации и методом бесконтактной печати Клиническая лабораторная диагностика. 2020;65 (1): 16-23. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-16-23*

Shpilevaya M.V.[1], Runina A.V.[1], Filippova M.A.[2], Kubanov A.A.[1]

COMPARISON OF IMMUNOARRAYS FOR SYPHILIS DIAGNOSTICS PRODUCED BY CO-POLYMERIZATION IMMOBILIZATION AND NON-CONTACT PRINTING TECHNIQUES

[1]State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology 107076, Moscow, Russia;

[2]The V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, 119991, Moscow, Russia

The aim of the study was to investigate the characteristics of immunoarrays (microarrays) produced by co-polymerization immobilization and non-contact printing techniques for enhancing the capacities of syphilis diagnostics. In diagnostic context immunoarrays of both protein immobilization techniques have shown high sensitivity and specificity together with potency to differentiate syphilis stages in serologic assays. The article discloses the advantages and limitations of non-contact printing techniques as well as the results and problems revealed in the study. Solution of these problems in future may provide the development of new serodiagnostic tools with higher accuracy of the results.

Keywords: *immunoarray; microarray; serological test; recombinant antigens; T. pallidum.*

For citation: *Shpilevaya M.V., Runina A.V., Filippova M.A., Kubanov A.A. Comparison of immunoarrays for syphilis diagnostics produced by co-polymerization immobilization and non-contact printing techniques. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020;65 (1): 16-23 (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-16-23*

For correspondence: *Shpilevaya M.V.,* Ph.D., senior researcher; e-mail: Aniram1970@list.ru

Information about authors:

Shpilevaya M.V., https://orcid.org/0000-0002-9957-4009

Runina A.V., http://orcid.org/0000-0003-3177-2823

Filippova M.A., https://orcid.org/0000-0002-9454-5938

Kubanov A.A., https://orcid.org/0000-0002-7625-0503

Acknowledgment. *The study was financed by the State Assignment № 056-00138-19-00 of Ministry of Health of Russian Federation for State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology in 2019. We thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences (Agreement №075-15-2019-1660 with the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation).*

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

Received 11.11.2019
Accepted 19.11.2019

Для корреспонденции: *Шпилевая Марина Валентиновна*, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. инфекций, передаваемых половым путём, и дерматозов; e-mail: Aniram1970@list.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-65-1-16-23

Введение. Одним из основных направлений современной медицины является мультиплексная диагностика, которая предполагает одновременное определение множества различных аналитов в одном образце. При разработке систем для комплексного выявления маркеров инфекционных заболеваний перспективным подходом представляется использование технологии микрочипов (биочипов).

Главным элементом микрочипа является матрица микроячеек- эррей (см. рисунок). Функциональная единица эррея – спот – содержит уникальный индивидуальный зонд, специфичный к конкретной биологической молекуле или её фрагменту. Зондами могут служить фрагменты геномной ДНК или РНК, белки, олигосахариды и др. Объём капли для формирования спота измеряется пиколитрами [1], а его диаметр составляет 50 - 300 мкм. Споты располагаются упорядоченными рядами. Количество эрреев на микрочипе и количество спотов в пределах эррея зависят от задач исследования и могут варьироваться.

В зависимости от вида материала, сорбированного на подложке, микрочипы разделяют на ДНК-чипы [2], белковые чипы [3, 4], а также клеточные [5] и тканевые [6] микрочипы. Матрицы, где в качестве зондов иммобилизованы белковые молекулы, называются «белковыми чипами» или «иммуночипами». Для регистрации результатов анализа на белковых чипах используют вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками [7-9]. Учёт результатов основан на детекции флуоресценции метки вторичных антител, связавшихся с определёнными белковыми молекулами в эррее в процессе гибридизации. В качестве флуорофоров наиболее часто используются цианины Cy3 (длина волны возбуждения 554 нм, длина волны эмиссии 568 нм) и Cy5 (длина волны возбуждения 635 нм, длина волны эмиссии 670 нм). Детекция флуоресцентных сигналов в спотах иммуночипов осуществляется на специальном оборудовании – чип-ридерах. Современные чип-ридеры включают в себя несколько лазеров и фильтров, позволяющих регистрировать флуоресцентные сигналы различных флуорофоров, после чего полученная информация обрабатывается и переводится в цифровые значения соответствующими компьютерными программами.

Публикации, в которых в качестве инструмента научного исследования упоминаются микрочипы, появились в конце 1990-х годов [2,3,7,10]. К настоящему времени опубликовано большое число работ, посвящённых разным методам изготовления и применения белковых микрочипов [11-18]. В России разработана и применяется технология гидрогелевых иммуно- и ДНК-биочипов [19]. Тем не менее, продолжаются работы по изготовлению белковых чипов на основе других технологий [20, 21], что свидетельствуют о заинтересованности исследователей в развитии данного диагностического инструмента. Широкие возможности в этом направлении представляет технология бесконтактной печати.

В рамках государственного задания в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России выполняется проект по созданию белковой мультиплексной платформы для диагностики сифилиса [22-29]. В рамках данного проекта были разработаны 2 вида иммуночипов, созданных с использованием двух технологий: сополимеризационной иммобилизации и бесконтактной печати. Оба вида иммуночипов предназначены для проведения лабораторных диагностических исследований *in vitro* с целью раздельной идентификации антител классов IgG и IgM к расширенной панели антигенов *T. pallidum* в биологическом материале (сыворотке крови) в реакции непрямой иммунофлуоресценции (нРИФ). Разработка многопараметрической системы для диагностики сифилиса на основе иммуночипа позволит с высокой специфичностью и чувствительностью проводить скрининг на сифилис и обеспечит новые аналитические возможности, связанные с вероятностной дифференциацией разных форм данного заболевания и контролем эффективности его лечения.

Целью исследования явилось сравнение диагностических и технологических характеристик иммуночипов, изготовленных с использованием двух технологий – сополимеризационной иммобилизации и бесконтактной печати.

Материал и методы. Микрочипы (иммуночипы), созданные по технологии сополимеризационной иммобилизации, были изготовлены в рамках сотрудничества с ООО «Биочип-ИМБ» на базе Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН. Принципиальным отличием данной технологии является размещение зондов не на плоской поверхности подложки, а в элементах гидрогеля полусферической формы [14]. Растворы зондов, смешанные с гелеобразующими мономерами, наносились на активированную поверхность стеклянной подложки с помощью

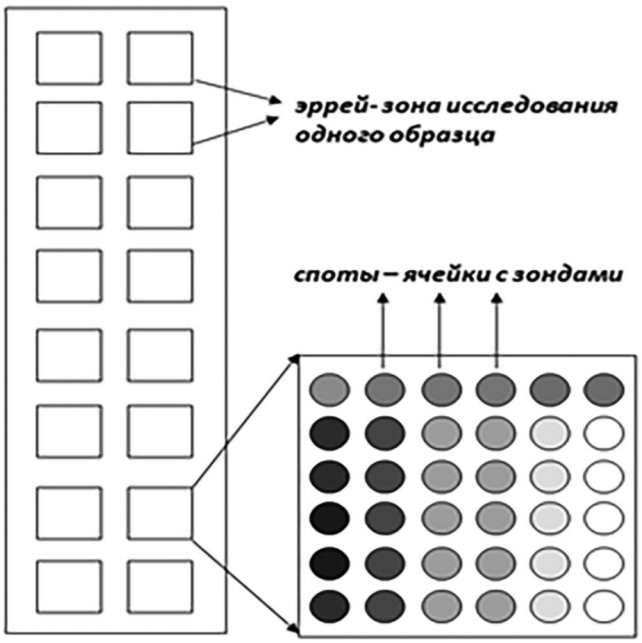


Схема микрочипа. Стрелками обозначены эрреи и отдельные споты.

игольчатых растров (пинов) механического робота. Под действием ультрафиолетового излучения происходила совместная полимеризация молекулярных зондов с основными компонентами геля. В результате этой реакции иммобилизуемые молекулы ковалентно присоединялись к мономерам растущей полимерной цепи и равномерно распределялись во всем объеме каждой гидрогелевой ячейки. Контроль качества нанесения осуществлялся с помощью специализированной оптики и компьютерного анализа изображения. Эррей иммуночипа покрывали реакционной камерой, в которой происходило взаимодействие иммобилизованных зондов с комплементарными белками. Один иммуночип может быть использован для анализа одного образца сыворотки крови.

Иммуночипы, созданные по технологии бесконтактной печати, изготовлены в ГНЦДК с использованием споттера *Sciflexarrayer S1* (*Scenion*, Германия). Основная рабочая часть споттера - диспенсер с пьезоэлектрическим дозатором, который наносит на поверхность слайда капли зондов объёмом 300-360 пиколитров. Белки наносились на поверхность стеклянных слайдов *Nexterion* (*Schott,* США) с гидрогелевым покрытием, которое сохраняет трёхмерную структуру сорбированного белка, поддерживая его стабильность и функциональность. Для проведения диагностического исследования иммуночип помещали в специальную рамку с трафаретом, разделяющим 16 реакционных камер. Таким образом, на иммуночипе, выполненном методом бесконтактной печати, можно анализировать одновременно 16 образцов сыворотки крови.

Расширенная панель диагностических антигенов, иммобилизованных на иммуночипах, включала 10 рекомбинантных антигенов *T. pallidum:* 4 коммерчески доступных антигена (Tp15, Tp17, TmpA, Tp47), традиционно применяемые для трепонема-специфической диагностики сифилиса, и 6 антигенов (Tp0277, Tp0319, Tp0453, Tp0684, Tp0965 и Tp1038), синтезированных *de novo* в ГНЦДК. Рекомбинантные белки Tp0277, Tp0319, Tp0453, Tp0684, Tp0965 и Tp1038 депонированы в Биоресурсном центре «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов на базе НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика (регистрационные номера 13267, 13268, 13266, 13458, 13457 и 13459, соответственно). Схема эррея с 10 антигенами в четырёх повторах каждый, а также контрольными ячейками и ячейками, маркирующими границы эррея [26], была использована в экспериментах по сравнению диагностических характеристик иммуночипов, изготовленных с применением двух технологий. В экспериментах по изучению динамики профиля иммуноглобулинов двух классов у больных разными формами сифилиса и по исследованию возможности дифференциации форм сифилиса к десяти описанным антигенам были добавлены ещё два коммерческих рекомбинантных белка Tp0163 и Tp0971, также в четырёх повторах каждый, то есть, эррей содержал 12 рекомбинантных антигенов [29].

Исследование на иммуночипах двух видов проводилось по единой методике. В каждый эррей вносили образец сыворотки крови в разведении 1:10 в 1-кратном фосфатно-солевом буфере (1xPBS) с 0,05% Tween 20. После инкубации и отмывки несвязавшегося материала в 1xPBS с 0,05% Tween 20 вносили вторичные антитела к иммуноглобулину IgG человека, меченые Cy5 и антитела к иммуноглобулину IgM человека, меченые Cy3, после чего иммуночипы ополаскивали деионизированной водой, высушивали в потоке воздуха и сканировали с помощью чип-ридера. Данные сканирования каждого эррея интерпретировались в цифровом формате в программе, поставляемой в комплекте с чип-ридером.

Для исследования были использованы образцы сыворотки крови больных различными формами сифилиса, диагноз которым установлен в соответствии с клиническими рекомендациями Российского общества дерматовенерологов и косметологов[1], а также образцы сыворотки крови здоровых индивидов.

Результаты и обсуждение. Нанесение рекомбинантных белков на поверхность матрицы методом бесконтактной печати выявило ряд особенностей данного подхода. Возникли технические сложности, связанные с иммобилизацией на поверхность иммуночипа двух рекомбинантных белков Tp0684 и Tp0965, печать которых так и не удалось осуществить. Использование для приготовления белковых растворов как 150 mM фосфатного буфера pH 8,5 (рекомендованного производителем споттера), так и фосфатно-солевого буфера (PBS) pH 7,4 приводило к стеканию аспирированного материала с кончика диспенсера (капилляра) и автоматическому прерыванию процесса печати. По этой причине на иммуночипе, созданном по технологии бесконтактной печати, данные антигены отсутствуют. Кроме того, выявлена нестабильность печати белка Tp0453, которая выражалась в пропуске капель (т.е. варьировании размера и количества спотов) и разбрызгивании материала с попаданием в соседние споты. Эрреи, содержащие описанные артефакты, выбраковывались в процессе контроля качества печати. Приведённые недостатки свойственны для бесконтактной печати на данном этапе разработанности методики. По данным литературы, ряд белков при необходимой для печати концентрации могут обладать высокой вязкостью, низким поверхностным натяжением, высокой ионной силой, что делает невозможным процесс их нанесения на поверхность слайда [30-32]. Для улучшения качества печати белковых растворов выпускаются пьезоэлектрические капилляры с модифицированной внутренней поверхностью [33].

В случае печати с использованием технологии сополимеризационной иммобилизации подобных проблем не описано.

[1] Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. 5-е изд., перераб. и доп. М. : Деловой экспресс; 2016: 679-720.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-65-1-16-23

Диагностические характеристики иммуночипов, изготовленных по двум технологиям, определялись тестированием образцов сыворотки крови больных различными формами сифилиса. В качестве контроля были использованы образцы сыворотки крови здоровых индивидов. Данные иммунореактивности образцов сыворотки с рекомбинантными антигенами *T. pallidum* в нРИФ на иммуночипах обоих видов послужили основанием для расчёта индивидуальной чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной предсказательной ценности, а также диагностической эффективности каждого использованного антигена. Диагностические характеристики рекомбинантных антигенов иммуночипа, выполненного по технологии сополимеризации, описаны ранее [26]. В табл. 1 приведены аналогичные параметры рекомбинантных белков *T. pallidum,* нанесённых методом бесконтактной печати. Антигены Tp0684 и Tp0965 в связи с описанными сложностями их иммобилизации на данной панели отсутствуют. Результаты исследований свидетельствуют о более низких диагностических характеристиках антигенов, нанесённых на иммуночип методом бесконтактной печати.

Интегральная оценка результатов исследования на иммуночипе с использованием формального критерия: положительной реакции сыворотки крови с 2 или более антигенами *T. pallidum* [12], при 100% специфичности позволила охарактеризовать как положительные 52 из 58 тестированных образцов сыворотки крови (90%). При этом учёт реакций с 4 традиционными иммунодоминантными антигенами охарактеризовал как положительные 40 образцов сыворотки крови (69%). Полученные результаты практически не уступают данным, полученным на иммуночипе, изготовленном по технологии сополимеризации [26]. Таким образом, использование двух описанных панелей антигенов повышает чувствительность скрининга до 90-91% с сохранением 100% специфичности.

Следующий этап работы включал использование иммуночипов с расширенной панелью из 12 антигенов *T. pallidum* для изучения динамики профиля иммуноглобулинов классов IgG и IgM у больных разными формами сифилиса. Исследованы образцы сыворотки крови, полученные до начала лечения и через 12 месяцев, в течение которых была проведена антимикробная терапия больных сифилисом. Результаты сравнивали с данными стандартных серологических тестов: нетрепонемного (*RPR*) и трепонемных (ИФА, РПГА), выполненных с теми же образцами сыворотки. Установлено, что полученные с использованием иммуночипа результаты подтверждают данные стандартных серологических тестов [29]. Показано, что технология иммуночипа даёт перспективу расширения диагностических возможностей стандартных серологических тестов при контроле качества проводимого лечения.

Контроль эффективности лечения базируется в первую очередь на изучении динамики иммуноглобулинов класса IgM, однако, на слайдах *Nexterion* (Schott, США), которые были использованы для иммобилизации рекомбинантных антигенов методом

Таблица 1

Диагностические параметры рекомбинантных белков *T. pallidum*, использованных в качестве антигенов для диагностики сифилиса в формате иммуночипа, изготовленного методом бесконтактной печати

Диагностические характеристики	Tp15*	Tp17*	Tp47*	TmpA*	Tp0453	Tp0319	Tp1038	Tp0277
Специфичность (%)								
Общая (*n*=58)	88,9	88,9	88,9	94,4	88,9	94,4	94,4	94,4
Чувствительность (%)								
Общая (*n*=58)	50,3	72,6	64,0	79,2	36,8	55,3	41,2	26,2
Первичный сифилис (*n*=11)	18,0	73,0	55,0	36,0	18,0	55,0	36,0	18,0
Вторичный сифилис (*n*=16)	100,0	94,0	100,0	100,0	88,0	69,0	19,0	38,0
Ранний скрытый сифилис (*n*=14)	64,0	71,0	57,0	93,0	29,0	64,0	64,0	36,0
Поздний скрытый сифилис (*n*=17)	12,0	53,0	41,0	76,0	6,0	35,0	47,0	12,0
Положительная предсказательная ценность (%)								
Общая (*n*=58)	93,5	95,5	94,9	97,9	91,3	96,9	96,0	93,8
Отрицательная предсказательная ценность (%)								
Общая (*n*=58)	64,4	50,0	56,8	41,4	69,8	60,5	66,7	71,7
Диагностическая эффективность (%)								
Общая (*n*=58)	59,2	76,3	69,8	82,9	48,7	64,5	53,9	42,1

Примечание. * – антигены, используемые в регламентированных серологических исследованиях для диагностики сифилиса.

Таблица 2

Распределение анализируемых образцов сыворотки крови в соответствии с формами сифилиса на основе использования дифференцирующих линейных уравнений, учитывающих результаты исследования антител классов IgG и IgM к расширенной панели из 12 рекомбинантных антигенов *T. pallidum*, изготовленной по технологии сополимеризации

Дифференцируемые группы	Отнесение наблюдений к формам заболевания с использованием линейных уравнений дифференциального анализа				
	Эффективность дифференциации, %	(1)*	(2)*	(3)*	(4)*
(1) Вторичный сифилис (*n*=19)	94,7	18	0	1	0
(2) Ранний скрытый сифилис (*n*=20)	80,0	1	16	3	0
(3) Поздний скрытый сифилис (*n*=19)	89,4	0	0	17	2
(4) Здоровые (*n*=27)	96,2	0	0	1	26
Всего (*n*=85)	90,5	19	16	22	28

Примечание. Здесь и табл.3 - обозначения *1-4 в колонках аналогичны обозначениям в строках.

Таблица 3

Распределение анализируемых образцов сыворотки крови в соответствии с формами сифилиса на основе использования дифференцирующих линейных уравнений, учитывающих результаты исследования антител классов IgG и IgM к расширенной панели из 10 рекомбинантных антигенов *T. pallidum*, изготовленной по технологии бесконтактной печати

Дифференцируемые группы	Отнесение наблюдений к формам заболевания с использованием линейных уравнений дифференциального анализа				
	Эффективность дифференциации, %	(1)*	(2)*	(3)*	(4)*
(1) Вторичный сифилис (*n*=19)	87,5	14	1	0	1
(2) Ранний скрытый сифилис (*n*=20)	100,0	0	17	0	0
(3) Поздний скрытый сифилис (*n*=19)	83,3	1	1	15	1
(4) Здоровые (*n*=27)	100,0	0	0	0	21
Всего (*n*=85)	93,0	15	19	15	23

Таблица 4

Сравнительные характеристики иммуночипов, выполненных по технологии бесконтактной печати и технологии сополимеризационной иммобилизации

	Параметры сравнения	Бесконтактная печать	Метод сополимеризации
		Диагностические характеристики	
1	Чувствительность / Специфичность (%)	90/100	91/100
2	Фоновая реакция	Высокая при определении уровня антител класса IgM	Незначительная
		Технологические и эксплуатационные характеристики	
1	Количество исследований на 1 слайде	16	1
2	Стабильность печати	Качество печати связано с подбором диспенсера. В противном случае нестабильная печать или невозможность печати определенных антигенов	Широкие возможности печати Полимеризация в геле стабилизирует наносимые аналиты
3	Сроки и условия хранения напечатанного слайда	1 год при 4ºС в вакуумной упаковке, исключающей высыхание гелевой подложки	1 год при 4ºС в картонной коробке
4	Необходимое оборудование для проведения анализа	Рамка-держатель и рамка-трафарет для разделения эрреев должны приобретаться отдельно	Есть реакционная камера на каждом чипе
5	Сканирующая система	Чип-ридер общего типа, позволяющий считывать спектры 2 флуорофоров	Специализированное готовое оборудование с программным обеспечением
6	Программируемый анализ данных с выдачей результата	Обработка данных в программе *Exel*	Обработки данных в универсальном аппаратно-программном комплексе для анализа биочипов (УАПК)
7	Сертификация оборудования для клинических лабораторных исследований в РФ	нет	есть

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-65-1-16-23

бесконтактной печати, при определении уровня IgM в образцах сыворотки крови фиксировался высокий уровень неспецифического фонового сигнала, обусловленный конъюгатом козлиных антител к иммуноглобулину IgM человека, меченому флуоресцентным красителем Cy3 (KPL, США). Неспецифический фоновый сигнал не удалось снизить ни блокировкой буфером, рекомендованным фирмой *Schott* (100 мМ фосфатный буферный раствор с 25 мМ этаноламина и 0,01% Tween 20 pH 8.5), ни добавлением к раствору конъюгата бычьего сывороточного альбумина (до концентрации 1%), ни сокращением времени инкубирования с конъюгатом, ни использованием меньших концентраций конъюгата. В итоге низкое соотношение специфического сигнала к фоновому значению флуоресценции не позволило оценить изменение уровня IgM в образцах сыворотки крови больных сифилисом в процессе лечения.

На третьем этапе работы проведено исследование возможности дифференциации форм сифилиса с использованием иммуночипов, изготовленных по двум описанным технологиям. Для вероятностной дифференциации форм сифилиса на основе выявления иммуноглобулинов классов IgG и IgM в сыворотке крови больных использован метод линейного дискриминантного анализа, формирующий оптимальное множество признаков, по которым распределение групп внутри выборки осуществлялось бы наиболее верно. Применение алгоритма линейного дискриминантного анализа позволяет сформировать систему классификационных функций общего вида:

$D = a_1(ФЛ_{Tp15}) + a_2(ФЛ_{Tp17}) + \ldots + a_n(ФЛ_{TpN}) + b,$

где: D – классификационное значение дискриминантной функции; $ФЛ_{Tp15}$-$ФЛ_{TpN}$ – независимые переменные, соответствующие интенсивности флуоресценции (о. е.) в ячейке с определенным антигеном; a_1-a_n – коэффициенты уравнения, характеризующие вклад каждой из независимых переменных в дискриминации групп; b – поправочная константа.

Объектом исследования стали образцы сыворотки крови больных вторичным (*n*=19), ранним скрытым (*n*=20) и поздним скрытым сифилисом (*n*=19). Диагноз установлен лечащим врачом на основании клинических данных и результатов стандартных серологических тестов. В исследование включены также сыворотки крови здоровых индивидов (*n*=27). В соответствии с классификационным значением дискриминантной функции каждый образец сыворотки с присущим ему спектром антител был отнесён к одной из трёх групп, соответствующих определенной форме заболевания, и к группе здоровых индивидов (табл. 2, 3).

Полученные результаты показали, что применение панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* для определения иммуноглобулинов двух классов к каждому из антигенов даёт возможность дифференцировать больных представленными формами сифилиса и здоровых индивидов вне зависимости от способа иммобилизации антигенов. Эффективность дифференциации отдельных форм сифилиса превышает 80%. Стоит отметить, что более высокие показатели эффективности дифференциации демонстрирует иммуночип с бесконтактным нанесением рекомбинантных белков.

Таким образом, проведена сравнительная оценка иммуночипов, изготовленных с использованием двух разных технологий на примере решения трех диагностических задач. Кроме вышеописанных различий двух типов иммуночипов существуют особенности эксплуатационных характеристик, такие как сроки и условия хранения готовых чипов, наличие специального сертифицированного оборудования для детекции результатов иммунофлуоресцентной реакции и анализа полученных данных. В табл. 4 представлены преимущества и недостатки как иммуночипов, так и методов их изготовления.

Заключение. Исследования, проведенные на иммуночипах с применением двух технологий, свидетельствуют о целесообразности разработки мультиплексных платформ для лабораторной диагностики *T. pallidum*. Их использование для определения уровня антител классов IgG и IgM против расширенной панели рекомбинантных антигенов *T. pallidum* позволяет решать задачи более эффективного выявления сифилитической инфекции, расширения диагностических возможностей стандартных серологических тестов и вероятностной дифференциации отдельных форм сифилиса. На двух видах иммуночипов получены непротиворечивые результаты. Отмеченные недостатки метода бесконтактной печати связаны с этапом его становления, и выполненная работа обозначила проблемы, которые предстоит решить, чтобы данная технология давала надёжные результаты и обеспечила новые возможности для постановки диагноза и контроля качества лечения.

Финансирование. *Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России № 056-00138-19-00 на 2019 год. Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины (Соглашение с Министерством науки и высшего образования № 075-15-2019-1660).*

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

ЛИТЕРАТУРА (пп.1-3, 6-10, 15, 21, 24, 30-33 см. REFERENCES)

1. Рубина А., Паньков С., Иванов С. и др. Белковые микрочипы. *Доклады Академии наук.* 2001; 5: 419-22.
2. Фесенко Д., Наседкина Т., Мирзабеков А. Бактериальный микрочип: принцип работы на примере обнаружения антибиотиков. *Доклады Академии наук.* 2001; 381 (6): 831-3.
3. Рябых Т.П., Осипова Т.В., Дементьева Е.И., Савватеева Е.Н., Коновалова Е.В., Соколова З.А. и др. Тест- система в формате биочипа для одновременного количественного определения общей и свободной форм простата-специфического антигена в сыворотке крови. *Российский биотерапевтический журнал.* 2006; 5 (2): 49-57.
4. Смердова М.А., Маркелов М.Л., Гущин А.Е., Судьина А.Е. и др. Разработка экспериментальной тест-системы на основе иммуночипа для серодиагностики сифилиса. *Журнал микробиологии.* 2008; 6: 54-8.
5. Манзенюк И.Н., Шипулин Г.А., Алексеева Ю.А. и др. Разработка иммуночипа для раздельной детекции антител к вирусу гепатита С. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2008; 6: 25–30.

6. Грядунов Д.А., Зименков Д.В., Михайлович В.М. Наседкина Т.В. Дементьева Е.И., Рубина А.Ю. и др. Технология гидрогелевых биочипов и ее применение в медицинской лабораторной диагностике. *Лаборатория*. 2009; 3: 10-4.
7. Рябых Т.П., Осипова Т.В., Соколова З.А., Паклин Н.Б., Грабко В.И. Оценка диагностических характеристик коммерческой мультиплексной системы на основе суспензионных микрочипов для количественного анализа белковых опухолевых маркеров. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2011; 22: 58-64.
8. Чеканова Т.А., Маркелов М.Л., Карань Л.С., Ушакова М.А., Пудова Е.А., Ромашкина А.С. и др. Новые возможности в серологической диагностике иксодовых клещевых боррелиозов с использованием иммуночипа. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 12: 51-5.
9. Ванг С., Фенг В. Прогресс в исследовании сайт-ориентированной и трёхмерной иммобилизации белков. *Молекулярная биология*. 2015; 49 (1): 3–25.
10. Грядунов Д.А., Шаскольский Б.Л., Наседкина Т.В., Рубина А.Ю., Заседателев А.С. Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя. *Acta naturae*. 2018; 10 (4): 4-18.
11. Зиновьев С.В., Терентьев И.Г., Уткин О.В., Фурминская Е.Ю., Федосеева Е.С., Савостикова М.В. Тест-система «Биочип-SER» для флюоресцентного иммуноцитохимического исследования экспрессии антигена Ep-CAM на материале выпотных жидкостей и смывов. *Современные технологии в медицине*. 2018; 10 (4): 34-41.
12. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Лесная И.Н., Фриго Н.В., Китаева Н.В., Ротанов С.В. и др. Способ диагностики сифилиса путем одновременного определения реагиновых и трепонемоспецифических антител к *T.pallidum* на микроскопных альдегидных слайдах Патент РФ № 2394496 С1; 2009.
13. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Фриго Н.В., Хайруллин Р.Ф., Ротанов С.В. Разработка биочипа для диагностики сифилиса путём одновременного определения антител к кардиолипину и специфическим антигенам *T. pallidum* (2012). Available at: https://docplayer.ru/43921944-Razrabotka-biochipa-dlya-diagnostiki-sifilisa-putem-odnovremennogo-opredeleniya-antitel-k-kardiolipinu-i-specificheskim-antigenam-t.html
14. Рунина А.В., Затевалов А.М., Катунин Г.Л., Дерябин Д.Г., Кубанов А.А. Варьирование иммунного ответа на антигены Tp0277, Tp0684, Tp0965 и Tp1038 *Treponema pallidum* при различных формах сифилиса. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 11(1): 70-8.
15. Рунина А.В., Катунин Г.Л., Филиппова М.А. Затевалов А.М., Кубанов А.А..Дерябин Д.Г. Иммуночип для серологической диагностики сифилиса с использованием расширенной панели рекомбинантных антигенов *Treponema pallidum*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018; 165 (6): 726-31.
16. Рунина А.В., Шпилевая М.В., Дерябин Д.Г. Иммуночип с расширенной панелью рекомбинантных антигенов *T. pallidum* для совершенствования серологической диагностики сифилиса. *Лабораторная служба*. 2018; 3(2):117.
17. Рунина А.В., Катунин Г.Л., Кубанов А.А. Дерябин Д.Г. Серологическая диагностика сифилиса у ВИЧ-инфицированных пациентов, основанная на использовании иммуночипа с расширенной панелью антигенов Treponema pallidum. *Российский иммунологический журнал*. 2018;12 (4): 48-54.
18. Рунина А. В., Шпилевая М. В., Филиппова М. А., Катунин Г.Л., Кубанов А.А. Применение иммуночипа с панелью из 12 диагностических антигенов *T. pallidum* для изучения динамики профиля иммуноглобулинов классов IgG и IgM в сыворотке крови больных сифилисом до и после терапии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(9): 546- 52.

REFERENCES

1. Papen R. Nanoliter dispensing for Drug Discovery. Presented at the IBC Conference on Microfabrication and Microfluidic Technologies. San Diego; 1997; August: 7-8.
2. Khrapko K., Lysov Yu., Khorlin A. et al. An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Letters*. 1989; 256: 118-22.
3. Arenkov P., Kukhtin A., Gemmell A. et al. Protein microchips: Use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal. Biochem*. 2000; 278: 123-31.
4. Rubina A.Yu., Pan'kov S.V., Ivanov S.M., Dement'eva E.I., Mirzabekov A.D. Protein microchips. *Doklady Akademii Nauk*. 2001; 5: 419-22. (in Russian)
5. Fesenko D., Nasedkina T., Mirzabekov A. Bacterial microchip: principle of operation using antibiotic detection as an example. *Doklady Akademii Nauk*. 2001; 381 (6): 831-3. (in Russian)
6. Huh D., Matthews BD., Mammoto A. et al. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science. 2010*; 25 (328): 1662-8.
7. Eikins R. Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clinical Chemistry*. 1998; 44: 2015-30.
8. Espina V., Woodhouse E.C., Wulfkuhle J. et al. Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies. *J. Immunol. Meth*. 2004; 290: 121-33.
9. Nielsen U., Geierstanger B. Multiplexed sandwich asseys in microarray format. *J. Immunol. Meth*. 2004; 290: 107-20.
10. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature genetics. 1*996; 14: 45760.
11. Ryabykh T.P., Osipova T.V., Dementieva E.I. et al. Biochip-based test-system for simultaneous quantitative determination of prostate-specific antigen (total and free forms) in blood serum. *Rossijskiy bioterapevticheskiy zhurnal*. 2006; 5 (2): 49-57. (in Russian)
12. Smerdova M.A., Markelov M.L., Gushchin A.E., Sudyna A.E. et al. Development of experimental test-system on the basis of immunochip for syphilis serodiagnostics. *Zhurnal mikrobiologii*. 2008; 6: 54-8. (in Russian)
13. Chekanova T.A., Markelov M.L., Manzenyuk I.N., Shishova A. V., Alekseeva Yu.A. et al. Design of an immunochip for separate detection of hepatitis C virus antibodies. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 6: 25–30. (in Russian)
14. Gryadunov D.A., Zimenkov D.V., Mihaylovich V.M. Nasedkina T.V. Dement'eva E.I., Rubina A.Yu. The technology of hydrogel biochips and its application in medical laboratory diagnostics. *Laboratoriya*. 2009; 3: 10-4. (in Russian)
15. Sanchez-Carbayo M. Antibody array-based technologies for cancer protein profiling and functional proteomic analyses using serum and tissue specimens. *Tumour Biol*. 2010; 31(2): 103–12.
16. Ryabykh T.P., OsipovaT.V., Sokolova Z.A., PaklinN.B.,Grabko V.I. Assessment of diagnostic potentials of a commercial multiplex suspension microchip-based system for quantitative analysis of protein tumor markers. *Vestnik RONC im. N.N. Blohina RAMN*. 2011; 22: 58-64. (in Russian)
17. Tchekanova T.A., Markelov M.L., Karan L.S., Ushakova M.A., Pudova E.A., Romashkina A.S. et al. The new possibilities in serologic diagnostic of ixodes mite-borne borreliosis using immunochip. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 12: 51-5. (in Russian)
18. Wang C., Feng B. Research progress on site-oriented and three dimensional immobilization of protein. *Moleculyarnaya Biologiya*. 2015; 49 (1): 3–25. (in Russian)
19. Gryadunov D.A., SHaskol'skij B.L., Nasedkina T.V., Rubina A.YU., Zasedatelev A.S. The technology of hydrogel biochips IMB RAN: 30 years later. *Acta naturae*. 2018; 10 (4): 4-18. (in Russian)
20. Zinoviev S.V., Terentiev I.G., Utkin O.V., Furminskaya E.Yu., Fedoseeva E.S., Savostikova M.V. Biochip-SER test system for fluorescent immunocytochemical analysis of ep-cam antigen expression in effusions and washes. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2018; 10(4): 34-41. (in Russian)
21. Canonica G.W., Ansotegui I.J., Pawankar R. et al. A WAO — ARIA — GALEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J*. 2013; 6 (1):17.
22. Kubanova A.A., Kubanov A.A., Lesnaya I.N., Frigo N.V., Kitaeva N.V., Rotanov S.V. et al. A method for the diagnosis of syphilis by simultaneous determination of reagin and treponemospecific antibodies to *T. pallidum* on microscopic aldehyde slides. Patent RF N 2394496 C1; 2009. (in Russian)

23. Kubanov A., Runina A., Deryabin D. Novel *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Syphilis Diagnostics: Current Status and Future Prospects. *Biomed Research International*. 2017; Article ID 1436080.
24. Runina A. V., Zatevalov A. M., Katunin G. L., Deryabin D.G., Kubanov A.A. Variation of immune response to tp0277, tp0684, тр0965 and тр1038 treponema pallidum antigens in different syphilis stages. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal.* 2017; 11(1): 70-8. (in Russian)
25. Runina A.V., Katunin G.L., Filippova M.A., Zatevalov A.M., Kubanov A.A., Deryabin D.G. Immunochip for serological diagnosis of syphilis using an extended panel of recombinant antigens T. pallidum. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2018; 165(6): 726-31. (in Russian)
26. Runina A., Shpilevaya M.V., Deryabin D. Immunochip with an extended panel of recombinant antigens T. pallidum. For to improve the serological diagnosis of syphilis. *Laboratornaya sluzhba*. 2018;3(2):117. (in Russian)
27. Runina A., Katunin G., Kubanov A., Deryabin D. Serological Diagnostics of Syphilis in HIV-positive Patients Using Immune-microarray with Expanded Panel of *Treponema Pallidum* Antigens. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal.* 2018;12(4): 48-54. (in Russian)
28. Runina A.V., Shpilevaya M.V., Filippova M.A., Katunin G.L., Kubanov A. A. Diagnostic imminoarray assay for characterization of immunoglobulin IgG and IgM level in syphilis patients serum towards 12 recombinant antigens of *T. pallidum* before and after the therapy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2019; 64(9): 546-52. (in Russian)
29. McWilliam I., Kwan M. C., Hall D. Inkjet Printing for the Production of Protein Microarrays *Methods in molecular biology.* 2011; 785: 345–61.
30. Wu P., Grainger D. W. Comparison of Hydroxylated Print Additives on Antibody Microarray Performance. *Journal of Proteome Research.* 2006; 5: 2956–65.
31. Gutmann O., Kuehlewein R., Reinbold S. et al. Fast and reliable protein microarray production by a new drop-in-drop technique. *Lab. Chip.* 2005; 5: 675–81.
32. Scidrop pico Scenion AG. Technical Information Piezo Dispense Capillary (PDC). Available at: https://www.scienion.com/technology/scidrop-pico.

Поступила 11.11.19
Принята к печати 19.11.19

RUSSIAN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS. 2020; 65(1)
DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-24-28

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Серебровская Л.В.[1], Иванова Л.А.[1], Селимова Л.М.[2], Калнина Л.Б.[2], Носик Д.Н.[2]

ИЗУЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЁННОГО И ПРИОБРЕТЁННОГО КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

[1]ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, Россия;
[2]Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва, Россия

Предпринята попытка выявить дополнительные лабораторные маркёры белой крови для предварительной оценки течения ВИЧ-инфекции, которые не требуют использования сложного оборудования и дорогостоящих реактивов. Изучены изменения основных показателей иммунокомпетентных клеток периферической крови ВИЧ-инфицированных пациентов в процессе инфекции, получающих и не получающих антиретровирусную терапию (АРТ). Определяли показатели лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, Т-лимфоцитов, CD_4^+, CD_8^+ Т-клеток, CD_4/CD_8 индекс. Использован первый анализ при постановке пациента на диспансерное наблюдение и промежуточный, полученный в течение 2017-2018 гг. У пациентов без АРТ и с АРТ до и после лечения показатели по количеству лейкоцитов, лимфоцитов, Т-лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов были практически в пределах нормы. Основные изменения связаны с базовыми общепринятыми лабораторными показателями оценки течения ВИЧ-инфекции (значения CD_4^+ и CD_8^+ Т- клеток, CD_4/CD_8 индекс). Не удалось выявить дополнительные иммунные маркёры ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: *лейкоцит; нейтрофил; моноцит; Т-лимфоцит; ВИЧ-инфекция.*

Для цитирования: *Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. Изучение показателей врождённого и приобретённого клеточного иммунитета периферической крови пациентов с ВИЧ-инфекцией. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65(1): 24-28. DOI:http://dx.doi.org/10.18821.0869-2084-2020-65-1-24-28*

Serebrovskaya L.V.[1], Ivanova L.A. [1], Selimova L.M.[2], Kalnina L.B.[2], Nosik D.N.[2]

THE STUDY OF THE INNATE AND ACQUIRED CELLULAR IMMUNITY CHAINS INDICATORS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH HIV INFECTION

[1]«Central Research Institute of Epidemiology, Federal Supervision Service for Consumer Rights Protection and People's Welfare», 111123, Moscow, Russia;

[2]«The D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology» of «N.F. Gamaleya NRCEM», Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

In this study was made an attempt to reveal additional laboratory markers of white blood for preliminary estimation level of HIV-infection development. Essentially such markers these are in progress without complex equipment and expensive reagent. It was studied alterations of basic values cells of innate and acquired immunity of peripheral blood HIV-infected individuals with and without antiretroviral treatment (ART) during infection. It was estimate value leukocytes, neutrophils, monocytes, lymhpocytes, T-lymhpocytes, CD_4^+, CD_8^+ T-cells, CD_4/CD_8 index. It was used the first analysis in the time of registration for regular medical check-up and the intermediate derived during 2017-2018 years. Patients without ART and with ART before and after treatment had rates of leukocytes, lymhpocytes, T-lymhpocytes, monocytes and neutrophils within the normal guideline. Essential changes were observed in basic conventional laboratory parameters evaluation of HIV-infection dynamic (parameters of $CD_4^+$and CD_8^+ cells, CD_4/CD_8 index). Thereby it was impossible to reveal supplementary immunological markers of HIV-infection.

Keywords: *leukocyte; neutrophil; monocyte; T-lymhpocyte; HIV-infection.*

For citation: *Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A., Selimova L.M., Kalnina L.B., Nosik D.N. The study of the innate and acquired cellular immunity chains indicators in the peripheral blood of patients with HIV infection. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65(1): 24-28. (in Russ.). DOI:http://dx.doi.org/ 10.18821/0869-2084-2020-65-1-24-28*

For correspondence: *Selimova L.M.,* doctor of biological sciences, leading researcher; e-mail: lselim@mail.ru

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 11.11.2019
Accepted 14.11.2019

Введение. Более 30 млн человек в мире живёт с ВИЧ-инфекцией. В большинстве стран Европы количество ежегодно выявляемых новых случаев снижается, в России этот показатель растёт. Россия занимает 4-е место в мире по скорости появления новых случаев заражения. В конце 2018 г. насчитывалось более 1 млн человек взрослого населения в возрасте 15-49 лет с ВИЧ-инфекцией. Борьба с инфекцией, которая относится к неизлечимым болезням, представляет не только медицинскую, но и социально-экономическую проблему. Необходимо наличие качественных и высокоточных лабораторных методов оценки течения инфекции.

Для корреспонденции: *Селимова Людмила Мидатовна*, д-р биол. наук, вед. науч.сотр.; e-mail: lselim@mail.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-24-28

Иммунологическим маркёром развития ВИЧ-инфекции служит показатель определения в периферической крови (ПК) пациентов количества CD_4^+ Т-лимфоцитов. Среди лейкоцитов лимфоциты составляют 19~37%, из них на CD_3^+ Т-лимфоциты приходится ~50-75%. Т-клетки делятся на CD_4^+-клетки и CD_8^+-клетки, в норме их соотношение составляет 1,5-2. Количество CD_4^+-клеток – один из важных критериев, используемых в клинических лабораториях для наблюдения за течением ВИЧ-инфекции. Он позволяет оценивать степень иммунодефицита, период начала химиотерапии и антимикробной профилактики, уровень восстановления иммунной системы в процессе антиретровирусной терапии (АРТ). Использование этого маркёра рекомендовано ВОЗ в 1986 г. вскоре после открытия клеточного рецептора CD_4^+, используемого вирусом иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) для заражения клеток, и остаётся базовым [1]. Этот маркёр называют золотым стандартом оценки течения инфекции. Рецептор для ВИЧ экспрессируют иммуннокомпетентные клетки, относящиеся к моноцитам и CD_4^+ Т-лимфоцитам, которые являются мишенью для ВИЧ. Последнему компоненту клеточного звена иммунитета отводится важная роль в регуляции нормального функционирования всех звеньев системы. Снижение количества CD_4^+ Т-лимфоцитов происходит из-за цитопатической активности вируса и прогрессирующей гибели компонентов этого клеточного звена, обусловленной биогенетическими особенностями ВИЧ-1. В результате взаимодействия вируса и иммунной системы в организме пациента развивается хроническая гиперактивация всех её звеньев. Как следствие, возникает иммунодефицит. Течение ВИЧ-инфекции осложняется развитием оппортунистической инфекции различной этиологии. Перечисленные факторы ведут к критическому падению функциональной активности иммунной системы и смерти пациента [2]. Применяемые схемы АРТ, позволяют добиться существенного подавления репликации вируса и повышения уровня CD_4^+-клеток у пациентов даже с высоким уровнем вирусной нагрузки и низким числом этих клеток на начальных этапах лечения. Полного восстановления функциональной активности компонентов иммунной системы не происходит даже на фоне успешной АРТ [3].

Другим маркёром течения ВИЧ-инфекции является определение в ПК количества CD_8^+ Т-лимфоцитов [4], которым принадлежит основная роль в уничтожении инфицированных клеток и секреции противовирусных цитокинов. При инфекции их количество возрастает, а функциональная активность падает. Особенности и механизмы их функционирования в процессе болезни остаются недостаточно изученными.

В клинической практике рассчитывается иммунорегуляторный индекс (ИИ) на основе отношения CD_4^+/CD_8^+ [5]. Он строго коррелирует со степенью активации иммунной системы и снижением иммунокомпетентности. Его величина может быть низкой даже при отсутствии вирусной нагрузки (ВН) и относительно высоким количеством CD_4^+-клеток. Он рассматривается как простой и надёжный маркёр эффективности АРТ, наряду с определением ВН и количеством CD_4^+-клеток в ПК. В случае низких значений ИИ при АРТ выявляют пациентов, которым необходима смена терапии.

Перечисленные лабораторные маркёры относятся к адаптивному клеточному иммунитету, который активируется при заражении и действует в процессе развитии инфекции. Кроме него существует врождённый иммунитет роль которого заключается в быстром неспецифическом ответе. Клетки врождённого иммунитета препятствуют проникновению в организм любых чужеродных компонентов и патогенов, и уничтожают их на самых ранних этапах попадания в организм. Среди них можно отметить нейтрофилы и моноциты. Они вместе с лимфоцитами входят в состав лейкоцитов ПК. Среди лейкоцитов в среднем ~63% приходится на нейтрофилы, ~7% – на моноциты. Моноциты и нейтрофилы играют важную роль в адаптивном иммунном ответе при вирусных инфекциях. Существует обратная связь между функционированием клеток адаптивного и врождённого иммунитета. Моноциты и нейтрофилы служат связующим звеном между врождённым и адаптивным иммунитетом и являются участниками многих воспалительных заболеваний. Раньше исследованиям клеток врождённого иммунитета не уделялось должного внимания, но в последние годы появилось понимание, что врождённый иммунный ответ играет важную роль в патогенезе ВИЧ-инфекции. Если общее количество нейтрофилов и моноцитов не меняется, то может меняться их метаболизм, они могут секретировать вещества, влияющие на течение болезни.

Нейтрофилы – наиболее многочисленная группа клеток среди лейкоцитов, циркулирующих в крови и элиминирующих патогены. Они регулируют иммунный ответ, участвуя в восстановлении повреждённых тканей и мукозального гомеостаза. Нейтрофилы уничтожают патогены различными путями. При ВИЧ наблюдается снижение их функциональной активности, и их количество может также снижаться [6].

Моноцит – фагоцит периферической крови. Моноциты/макрофаги играют роль в патогенезе ВИЧ, и динамика их изменения может служить маркёром развития инфекции. Одной из причин активации моноцитов служит транслокация микробов через слизистую оболочку кишечника, которая активирует врождённый иммунитет. Увеличение макрофагов в очаге инфекции сопровождается увеличением моноцитов в крови и их миграцией в места воспаления [7].

Особенности изменения различных типов лейкоцитов ПК пациентов с ВИЧ-инфекцией, получающих и не получающих АРТ, представлены в данном исследовании. Изучена возможность использования показателей этих клеток для более полной характеристики особенностей течения ВИЧ-инфекции и поиска дополнительных суррогатных маркёров, получение которых не требует дорогих, высокотехнологичных и сложных методов и оборудования.

Материал и методы. Использованы образцы плазмы ПК пациентов (3-я и 4-я стадии инфекции), находящихся на диспансерном наблюдении в Специализированном научно-исследовательском отделе

эпидемиологии и профилактики СПИД (СНИО ЭП СПИД). 14 образцов (4 женщины, 10 мужчин) получены от пациентов без терапии и 21 образец (7 женщин, 14 мужчин) от пациентов, принимающих АРТ, 10 образцов (5 женщин, 5 мужчин) от условно здоровых лиц (УЗЛ). АРТ проводили в соответствии со стандартными рекомендациями, принятыми в Российской Федерации. Возраст пациентов без терапии от 27 до 68 лет (μ39,1±13,4), с терапией – от 17 до 63 лет (μ36,7±10,7), условно здоровых лиц – от 19 до 64 лет (μ31,7±13,8). Взятие крови для иммунофенотипирования осуществляли утром, натощак, путём венепункции. Кровь собиралась в вакуумную пробирку VACUTANER, содержащую антикоагулянт K_3ЭДТА. Для определения гематологических показателей (общее количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, формула крови) образцы исследовали на гематологических анализаторах ACT diff, ACT diff 5 Beckman Coulter не менее чем через 40 мин после забора. Количество CD_3^+,CD_4^+,CD_8^+ лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии по безотмывочной технологии. Для иммунофенотипирования применялись моноклональные антитела: IOTest CD_3-PCy5/CD_4-PE/CD_8-ECD/CD_{45}-FITC (фирма Beckman Coulter, USA) и CD_3-FITC/CD_8-PE/CD_{45}-PerCP/CD_4–APC (фирма Becton Dickinson, USA). Окрашенные образцы исследовались на проточных цитофлуориметрах EPICS XL или FACS Calibur.

Результаты и обсуждение. Показатели иммунокомпетентных клеток ПК ВИЧ-инфицированных пациентов представлены в табл. 1 и 2 (последний анализ выделен жирным шрифтом). Исследование относится к рандомизированному. Использованы результаты анализов, полученные от пациентов в период постановки на диспансерное наблюдение (1-й анализ) и через некоторый промежуток времени (последний анализ). Среди пациентов, не получающих химиотерапию, в соответствии с абсолютным количеством CD_4^+-клеток ПК и сроком инфицирования оказалось возможным выделить четыре группы, среди пациентов с АРТ – 6 групп (по абсолютному количеству CD_4^+-клеток и периодом АРТ). Деление на группы по количеству клеток проводили в соответствии с последним анализом. Срок инфицирования и лечения брали из сведений о пациенте.

У пациентов, не получающих химиотерапию, показатели лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов, Т-лимфоцитов при 1-м и 2-м обследованиях находились в пределах нормы (см. табл. 1). Наблюдающиеся в некоторых группах отклонения от нормы в большинстве случаев не являлись существенными. Они не носили системного характера. Исключением можно считать изменения абсолютного количества нейтрофилов в первом и последнем анализах в объединённой группе, и в отдельных группах, за исключением группы CD_4^+<500 кл/мкл. В группе CD_4^+≥500 кл/мкл их количество снизилось на ~35%, при инфицировании ≤4 года – увеличилось на ~25%, при инфицировании >4 лет – снизилось на ~28%. Возможно это реакция организма на воспалительный процесс. Что касается показателей Т-лимфоцитов CD_4^+, CD_8^+, иммунорегуляторного индекса, то их значения и кинетика полностью соответствовали особенностям патогенеза ВИЧ-инфекции.

У пациентов, получающих АРТ (табл. 2) значения лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов, Т-лимфоцитов при 1-м и 2-м обследованиях находились в пределах нормы. Исключение составила группа CD_4^+<300 кл/мкл, у которой абсолютное количество Т-лимфоцитов ниже нормы на ~24%. Относительное количество CD_4^+-клеток для всех групп ниже нормы при первом анализе и повышалось во всех группах практически до нормы, за исключением пациентов с количеством CD_4^+<300кл/мкл. Эта группа имела очень низкий показатель при первом анализе. И на его фоне повышение при последнем анализе имело выраженный характер. Для других групп увеличение составляло от ~50 до ~85%. В абсолютном количестве значения практически соответствовали норме для большинства групп, кроме

Таблица 1

Показатели компонентов белых клеток периферической крови пациентов без лечения

Маркёры	Все 1-й/**посл.**	<500кл/мкл 1-й/**посл.**	≥500кл/мкл 1-й/**посл.**	≤4года 1-й/**посл.**	>4лет 1-й/**посл.**	Доноры
Лейкоциты ($x10^9$/л)	*6,25±1,5/**5,9±2,26***	*6,3±1,2/**6,3±2,7***	*6,1±1,9/**5,4±1,5***	*5,8±2,2/**6,6±3,5***	*6,7±1/**5,7±2***	*7,2±2,1*
Лимфоциты, % абс ($x10^9$/л)	*37,3±12/**40,4±11,4*** *2,1±0,6/* **2,28±0,74**	*34,6±7,8/**35,1±10,3*** *2,1±0,4/**2,1±0,8**	*40±15,6/**48,3±8,2*** *2,3±0,7/**2,5±0,6**	*44,2±15,7/**39,6±11,4*** *2,36±0,7/**2,3±0,6**	*32±7,4/**41,6±8*** *2,1±0,46/* **2,3±0,64**	*30,85±8,8* *2,2±0,8*
Нейтрофилы, % абс ($x10^9$/л)	*55,7±12,8/**52,6±12,7*** *3,6±1,4/**3,2±1,9**	*59,2±9/**58,6±11*** *3,8±1,3/* **3,8±2,1**	*52,2±16/**43,5±10*** *3,4±1,7/**2,2±1,1**	*49,7±17,5/**55±11,7*** *3,13±1,8/**3,9±2,9**	*61±8,4/**51±8,7*** *4,15±1,15/**3±1,4**	*63,4±8,7* *4,6±1,7*
Моноциты, % абс ($x10^9$/л)	*6,2±3,4/**6,7±2,9*** *0,38±0,2/**0,39±0,2**	*5±1,8/**5,7±2,2*** *0,31±0,07/**0,35±0,19**	*7,2±4,3/**8,2±3,3*** *0,44±0,3/**0,45±0,2**	*6±3,3/**5,4±2,3*** *0,35±0,3/**0,36±0,2**	*6,4±3,9/**6,4±2,2*** *0,41±0,21/**0,36±0,17**	*5,7±2,7* *0,36±0,13*
CD_3^+ % абс($x10^9$/л)	*74±8,2/**78,8±5,6*** *1,6±0,5/**1,77±0,6**	*75,7±6,6/**77,5±5*** *1,4±0,3/**1,6±0,7**	*73±9,7/**80,7±6,4*** *1,7±0,6/**2±0,5**	*77,5±9,68/**79±6*** *1,85±0,6/**1,8±0,4**	*67,7±0,58/**75,4±3,1*** *1,3±0,25/**1,7±0,54**	*73±7,6* *1,6±0,7*
CD_4^+, % абс ($x10^9$/л)	*32±9,3/**25,3±8,8***7 *0,7±0,29/**0,53±0,2**	*27,5±12,4/**21,2±8,3*** *0,66±0,3/**0,4±0,1**	*33,6±5,6/**31,5±5,6*** *0,7±0,2/**0,7±0,1**	*32,5±9,7/**28,8±9,8*** *0,73±0,3/**0,6±0,2**	*29,6±9,5/**23±10*** *0,65±0,34/**0,5±0,26**	*44±6,2* *1±0,5*
CD_8^+,% абс ($x10^9$/л)	*40,6±11,6/**51,1±10*** *0,87±0,27/**1,18±0,57**	*39,5±16/**54,2±10,2*** *0,8±0,3/**1,2±0,7**	*42±3,6/**46,5±8,3*** *0,9±0,2/**1,2±0,4**	*46,3±10,4/**48,2±8,9*** *1,08±0,25/**1,1±0,32**	*36,2±11,9/**50,4±11,6*** *0,7±0,17/**1,2±0,6**	*24,3±6,5* *0,53±0,26*
CD_4/CD_8	*0,9±0,7/**0,5±0,2***	*0,9±0,9/**0,43±0,2***	*0,8±0,2/**0,7±0,2***	*0,73±0,36/**0,59±0,28***	*1±0,86/**0,5±0,26***	*1,8±0,4*
ОНЛ	*1,7±0,9/**1,5±0,8***	*1,9±1/**1,8±0,8***	*1,6±0,8/**0,9±0,4***	*1,4±0,9/**1,6±0,9***	*2,1±0,9/**1,3±0,5***	*2,3±1,13*

Таблица 2

Показатели компонентов клеток белой крови пациентов, получающих АРТ

Маркёры	Все 1-й/**посл.**	<300кл/мкл 1-й/**посл.**	>300-≤600кл/мкл 1-й/**посл.**	>600 кл/мкл 1-й/**посл.**	≤3 года 1-й/**посл.**	>3-<6 лет 1-й/**посл.**	≥6 лет 1-й/**посл.**
Лейкоциты (x10^9/л)	4,8±1,3/**4,9±1,3**	4,6±1,6/**4,6±2**	4,4±0,9/**5,1±1,1**	6±1/**4,9±1**	3,8±0,6/**4,9±1,4**	5,42±1,3/**4,6±1,3**	4,87±1,35/**5,4±1,2**
Лимфоциты, % абс (x10^9/л)	31,7±11/**36,8±10,7** *1,5±0,6/**1,7±0,7***	26,4±10/**35,8±10** *1,1±0,2/**1,5±0,4***	34,1±13/**37,4±13** *1,5±0,6/**1,9±0,9***	32,7±6,8/**36,6±4,6** *2,0±0,7/**1,43±0,3***	33,4±17,2/**39,1±14** *1,25±0,62/**1,7±0,37***	30,7±10,4/**32,7±7,9** *1,63±0,65/**1,42±0,28***	31,3±6,6/**39,7±9,5** *1,54±0,55/**1,98±1,2***
Нейтрофилы, % абс (x10^9/л)	61±12,3/**55±11,6** *2,9±1,1/**2,8±1***	66,4±11/**56,6±10** *3±1,8/ **2,7±1,5***	58,8±15/**53,4±14,6** *2,5±0,8/**2,8±0,9***	59,2±6,2/**58±4,6** *3,5±05/**2,8±0,7***	57,8±19/**51,8±16** *2,1±1/**2,7±1,3***	62,4±10,5/**59,4±7,6** *3,43 ±1,15/**2,85±1***	62±9,2/**53,7±10,4** *2,8±1,1/**2,8±0,52***
Моноциты, % абс (x10^9/л)	6,9±2,6/**7,1±2,6** *0,4±0,2/ **0,37±0,17***	7,2±2,7/**7,6±2** *0,5±0,4/**0,4±0,2***	6,7±3,3/**7,8±2,9** *0,3±0,1/**0,4±0,1***	7±1,4/**5,4±2,3** *0,4±0,2/**0,26±0,1***	8,25±3,2/**8,2±1,7** *0,28±0,15/**0,45±0,17***	6,8±1,57/**6,75±3,1** *0,52±0,31/**0,32±0,19***	6,16±3,4/**6,7±2,7** *0,33±0,19/**0,35±0,12***
CD_3^+,% абс (x10^9/л)	72,5±15/**72,3±9,9** *1,06±0,6/ **1,2±0,3***	62,2±20/**67±9** *0,68±0,3/**1±0,3***	73,9±10/**71±11** *1,1±0,5/**1,3±0,4***	85±5,7/**78,8±5,4** *1,6±1/**1,2±0,2***	75,5±9,7/**78,3±7,6** *1±0,6/**1,34±0,23***	67,1±21/**68±5,3** *1,14±0,73/**0,94±0,25***	76,7±7,8/**71,2±14,3** *1±0,47/**1,35±0,37***
CD_4^+, % абс (x10^9/л)	16,3±8,9/**30±12,3** *0,3±0,2/**0,5±0,2***	7±5/**13±10** *0,2±0,2/**0,3±0,3***	17,7±6,9/**32,4±8,6** *0,27±0,1/**0,5±0,1***	25±6,2/**41,4±3,8** *0,47±0,12/**0,71±0,07***	16,6±11/**29,6±13** *0,21±0,18/**0,58±0,2***	14±9,1/**28,6±15,1** *0,34±0,21/**0,4±0,22***	18,8±7,8/**32,5±11** *0,3±0,15/**0,62±0,11***
CD_8^+, % абс (x10^9/л)	54,8±11,2/**39,5±12,8** *0,8±0,46/**0,67±0,3***	58±10/**50±15** *0,6±0,2/**0,7±0,3***	51,3±12,6/**36,7±11** *0,7±0,4/**0,7±0,3***	59,7±8,7/**34,8±8,6** *0,4±0,44/**0,6±0,2***	60,7±7,7/**47±11,5** *0,8±0,5/**0,8±0,26***	51±13,9/**36±13,6** *0,97±0,65/**0,5±0,23***	53±11,6/**35,8±11** *0,8±0,3/**0,75±0,3***
CD_4/CD_8	0,3±0,2/**0,9±0,5**	0,07±0,04/**0,35±0,1**	0,4±0,2/**0,94±0,4**	0,37±0,11/**1,26±0,44**	0,2±0,1/**0,69±0,4**	0,33±0,2/**0,97±0,65**	0,39±0,2/**0,98±0,4**
ОНЛ	2,3±1,5/**1,85±0,9**	2,8±1,8/**1,7±0,7**	2,2±1,6/**1,8±0,9**	1,9±0,6/**2,1±1**	2,3±2/**1,69±1**	2,5±1,6/**2±0,7**	2,1±9/**1,85±1**

групп CD_4^+< 300кл/мкл и сроком лечения от 3-х до 6-ти лет. В последнем случае это могло быть связано с тем, что в группах присутствовали пациенты с бактериальными инфекциями. В остальных группах наблюдалось увеличение количества CD_4^+-клеток в 1,5-2,8 раза. Количество CD_8^+-клеток в относительных количествах во всех группах выше нормы при первом анализе, при последнем анализе этот показатель снижался, для групп CD_4^+>600 кл/мкл и сроком лечения от 3-х до 6-ти лет и более 6 лет соответствовал норме. Абсолютное количество CD_8^+-клеток в большинстве групп соответствовало норме при первом анализе и во всех группах – в последнем. ИИ очень низкий для всех групп при первом анализе и повышался практически до нормы при последнем, кроме группы, получающей лечение ≤3 года. По результатам лабораторных анализов лечение пациентов эффективно.

В последние годы для характеристики уровня воспалительного процесса при различных инфекционных и хронических системных заболеваниях начали вводить показатель отношения абсолютного количества нейтрофилов к лимфоцитам (ОНЛ). Его повышение соответствует усилению воспалительного процесса [8]. Это отношение демонстрирует баланс компонентов активного воспаления и регуляторно-защитного. Мы попытались использовать этот показатель при анализе полученных данных. В группе УЗЛ этот показатель имел высокое значение, что указывает, что данная группа не может служить контролем для данного критерия. Эта группа имела и высокие показатели по увеличению экспрессии в клетках МТ-4 маркёров активации CD_{28}^+, CD_{38}^+, HLA-DR^+ [9]. Что же касается анализа данных пациентов, то можно отметить следующее. Как видно из табл. 1, в двух группах пациентов, не получающих АРТ, ОНЛ практически не изменялся и существенно снижался в группах с CD_4^+≥500 кл/мкл и сроком инфицирования >4 лет, что указывает, что у этих пациентов иммунная система естественным путём выработала способность снижать воспалительный потенциал, либо сохранять на неизменном уровне. У пациентов с АРТ (табл. 2) наблюдалось снижение этого показателя в процессе лечения. Исключение составила группа CD_4^+>600 кл/мкл. Это может быть связано с присутствием в ней большого количества пациентов с сопутствующей инфекцией и, соответственно, наличием в плазмах повышенного количества активирующих факторов. Данные по этим инфекциям отсутствуют. Полученные цифры указывают на то, что химиотерапия у большинства пациентов ведёт к снижению воспалительного потенциала. Данные по ОНЛ согласуются с результатами по изучению влияния плазм пациентов с лечением и без лечения на экспрессию маркёров активации в модельной системе [9].

Показатель ОНЛ может иметь низкую специфичность и чувствительность из-за высокой сложности и динамичности процессов, происходящих в организме на уровне иммунной системы. Неизвестно, как изменяется ОНЛ в случае наложения инфекционного процесса на хроническую болезнь. Этот фактор следует учитывать. В настоящее время нет чёткого представления, какое значение ОНЛ следует считать нормой.

Наши результаты вносят свой вклад в создание общей базы данных по этому критерию. Для эффективного использования показателя ОНЛ необходимы дополнительные исследования и накопление большего объёма данных, выработка критериев для создания контрольной группы.

Как показали результаты анализа общего количества различных клеток белой крови, изменения наблюдались только в тех маркёрах, которые, как правило, и используются для оценки течения ВИЧ-инфекции. Определение этих показателей требует наличия более сложной и дорогостоящей методики и оборудования. Было бы важно найти маркёры среди лейкоцитов, которые позволили бы предварительно оценивать уровень развития ВИЧ-инфекции с использованием других, более доступных для анализа клеток ПК. Проведена оценка полученных данных с использованием критерия линейной корреляции Пирсона для пациентов без лечения и с АРТ по всем типам клеток в выделенных группах пациентов. Стабильным показателем высокого уровня корреляции у всех пациентов было соотношение абсолютного количества лейкоцитов и нейтрофилов, и этот уровень корреляции близок к показателю УЗЛ.

Не удалось выявить ни один из возможных дополнительных маркёров клеток белой крови для оценки течения ВИЧ-инфекции с включёнными в исследование пациентами, так как полученные цифры сильно варьировали, и их анализ не выявил никакой зависимости от имеющихся сведений о пациентах. В каждом случае складывается специфический баланс между отдельными видами иммунокомпетентных клеток, и выделить какие-нибудь из них для предварительной оценки течения ВИЧ-инфекции оказалось невозможным.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-8 см. REFERENCES)

9. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Серебровская Л.В., Иванова Л.А., Носик Д.Н. Использование неопластической клеточной линии МТ-4 для изучения иммуномодулирующей активности плазмы ВИЧ-инфицированных пациентов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(7): 428-33.

REFERENCES

1. Kestens L., Mandy F. Thirty-Five Years of CD_4 T-Cell Counting in HIV Infection: From Flow Cytometry in the Lab to Point-of-Care Testing in the Field. *Cytometry.* Part B. 2017; 92B: 437-44.
2. Appay V., Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J. Pathol*. 2008; 214: 231-41.
3. Robbins G.K., Spritzler J.G., Chan E.S., Asmuth D.M., Gandhi R.T., Rodriquez B.A. et al. Incomplete reconstitution of T cell subsets on combination antiretroviral therapy in the AIDS Clinical Trials Group protocol 384. *Clin. Infect. Dis*. 2009; 48: 350-61.
4. Benito J.M., Lopez M., Soriano V. The role of CD_8+ T-cell response in HIV infection. *AIDS Rev*. 2004; 6:79-88.
5. Lu W., Mehraj V., Vyboh K., Cao W., Li T., Routy J.-P. CD_4:CD_8 ratio as a frontier marker for clinical outcome, immune dysfunction and viral reservoir size in virologically suppressed HIV-positive patients. *Journal of the International AIDS Society*. 2015; 18(1): 20052-9.
6. Cloke T., Munder M., Bergin P., Herath S., Modolell M., Taylor G. et al. Phenotypic Alteration of Neutrophils in the Blood of HIV Seropositive Patients. *PLoS ONE*. 2013; 8(9): e72034.
7. Joshua J., Anzinger J.J., Tiffany R., Butterfield T.R., Angelovich T.A., Crowe S.M. et al. Monocytes as Regulators of Inflammation and HIV-Related Comorbidities during cART. *Journal of Immunology Research*. 2014; Article ID 569819: 11.
8. Forget P, Khalifa C., Defour J.-P., Latinne D, Van Pel M.-C. and De Kock M. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Res. Notes*. 2017; 10:12-5.
9. Selimova L.M., Kalnina L.B., Serebrovskaya L.V., Ivanova L.A. , Nosik D.N. Application of MT-4 neoplasmic cell line for the study immunomodulating activity of patient plasma with HIV-infection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2019; 63(7): 428-33. (in Russian)

Поступила 11.11.19
Принята к печати 14.11.19

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-29-36

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Мавзютов А.Р.[1], Бондаренко К.Р.[2], Мавзютова Г.А.[1], Глазутдинова Л.Р.[1]

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ПАРАЛЛЕЛИ ПРИ АССОЦИИРУЕМЫХ С ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ И ПОГРАНИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ

[1]ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450008, Уфа, Россия;
[2]ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, Россия

Систематизированы данные о строении липополисахаридов (ЛПС) и их роли в физиологических и системных патологических процессах. Представлена информация о наиболее информативных лабораторных маркёрах у пациентов при ЛПС-ассоциируемых патологических и пограничных состояниях. Анализ литературы и собственных данных представляет научно-практический интерес для специалистов в области клинической лабораторной диагностики, анестезиологов-реаниматологов, терапевтов, иммунологов, акушеров-гинекологов, в том числе актуальны исследования о роли ЛПС в уникальных трёхкомпонентных системах – «мать-плацента-плод».

Обосновывается перспективность применения ЛПС в качестве иммуномодуляторов, в том числе для лечения инфекционных заболеваний. Показано, что наряду с применением ЛПС для коррекции иммунодефицитных состояний или разработки новых адъювантов и вакцин, возможно использование их высокой регуляторной активности даже на эпигенетическом уровне.

Обсуждается возможность профилактического и терапевтического применения ЛПС в контексте альтернативного решения проблемы антибиотикорезистентности бактерий.

Ключевые слова: *ЛПС; грамотрицательные бактерии; иммуномодулятор; клиническая лабораторная диагностика.*

Для цитирования: *Мавзютов А.Р., Бондаренко К.Р., Мавзютова Г.А., Глазутдинова Л.Р. Клинико-лабораторные параллели при ассоциируемых с липополисахаридами грамотрицательных бактерий патологических и пограничных состояниях. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1): 29-36. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-29-36*

Mavzyutov A.R.[1], Bondarenko K.R.[2], Mavzyutova G.A.[1], Glazutdinova L.R.[1]

CLINICAL AND LABORATORY PARALLELS AT PATHOLOGICAL AND BORDERLINE STATES ASSOCIATED WITH LIPOPOLYSACCHARIDES OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA

[1]Bashkir State Medical University; 450008, Ufa, Russia;
[2]FGBOU IN RNIMU them.N.I. Pirogov of the Ministry of Health of Russia, 117997, Moscow, Russia

The review systematizes data on the structure of lipopolysaccharides (LPS) and their role in physiological and systemic pathological processes. The analysis of literature and our own data is of scientific and practical interest for specialists in the field of clinical laboratory diagnostics, anesthesiologists, resuscitators, therapists, immunologists and obstetrician-gynecologists, including studies on the role of LPS in unique three-component systems – «mother-placenta-fetus».

The prospects of using LPS as immunomodulatory, including for the treatment of infectious diseases, are justified. It is shown that along with their use for the correction of immunodeficiency or the development of new adjuvants and vaccines, it is possible to use their high regulatory activity even at the epigenetic level. The possibility of the prophylactic and therapeutic use of LPS in the context of an alternative solution to the problem of antibiotic resistance of bacteria is discussed.

Keywords: *review; LPS, gram-negative bacteria; immunomodulatory; clinical laboratory diagnostics.*

For citation*: Mavzyutov A.R., Bondarenko K.R., Mavzyutova G.A., Glazutdinova L.R. Clinical and laboratory parallels at pathological and borderline states associated with lipopolysaccharides Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (1): 29-36. (in Russian). DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-29-36*

For correspondence*: Mavzyutov A.R.,* professor, MD (Medicine), The Head of the Fundamental and Applied Microbiology Department; e-mail: ufalab@mail.ru

Information about authors:

Mavzyutov A.R. – orcid.org/0000-0001-5943-1882

Bondarenko K.R. – orcid.org/0000-0003-4147-1151

Mavzyutova G.A. – orcid.org/0000-0003-2098-1435

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

Acknowledgments.*Some fragments of the work were carried out with financial support from the Foundation for Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Field under the program «UMNIK HEALTHNET NTI»-2017, Moscow.*

Received 11.11.2019
Accepted 20.11.2019

Для корреспонденции: *Мавзютов Айрат Радикович*, д-р мед.наук, проф., зав. каф. фундаментальной и прикладной микробиологии, проф. каф. лаб.диагностики; e-mail: ufalab@mail.ru

Доказано этиологическое значение «инфекционной составляющей» в ряде заболеваний и осложнений, развитие которых ранее не связывали с воздействием инфекционных агентов (атеросклероз, ожирение, сахарный диабет 2 типа и др.) [1]. Намного шире воспринимается значение комменсальной микробиоты человека в связи с её адаптогенным и протективным влиянием на функциональное состояние и гомеостаз человека в норме и при патологических состояниях [2]. Особое место в этой связи могут занять липополисахариды (ЛПС) грамотрицательной микробиоты.

Основным источником ЛПС в организме здорового человека являются грамотрицательные бактерии кишечника, удельный вес которых может достигать 70% от общей бактериальной биомассы [3]. С ЛПС ассоциируют формирование и «физиологический тонус» иммунной системы, что определяет в дальнейшем её адаптационные возможности [4], например, неспецифическую резистентность организма [5]. Имеются указания на влияние ЛПС на процессы старения [6]

Вероятным механизмом вышеуказанного *in vivo* является феномен транслокации ЛПС бактерий, отличающихся относительно невысокой молекулярной массой. ЛПС, преодолевая эпителиальные барьеры слизистых оболочек и, прежде всего кишечника, лимфогенным и/или гематогенным путём попадают в мезентеральные лимфатические узлы, где происходит их взаимодействие с иммунокомпетентными клетками лимфоидной ткани, ассоциированными с кишечником [7].

Иммуномодулирующие эффекты ЛПС бактерий носят дозозависимый характер. При концентрации 2-10 пкг/мл (0-1 EU/ мл) ЛПС оказывает иммуностимулирующее действие, что позволяет рассматривать этот уровень как физиологический. При высвобождении ЛПС в концентрациях, превышающих указанные значения, имеют место патологические реакции вплоть до полного угнетения иммунного ответа или напротив, развития системной воспалительной реакции. Избыточные концентрации ЛПС могут иметь место при ассоциируемых с грамотрицательными бактериями инфекциях, и в результате массивной гибели этих бактерий вследствие воздействия бактерицидных антибиотиков [5, 8].

Строение и биологическая активность ЛПС. ЛПС мозаично представлены в составе бислойного пептидогликана клеточной стенки всех грамотрицательных бактерий вне зависимости от их видовой принадлежности в комплексе с белками и другими полисахаридами. Высвобождение ЛПС происходит в ходе деления бактерий и самообновления клеточных популяций, массивное – при лизисе бактериальных клеток. ЛПС – термостабильный гетерополимер (мол. массой от 2,5-70 кДа), включающий липид А, ассоциированный с кетодеоксиоктанатом (KDO), сердцевинный полисахарид (core-регион), боковые полисахаридные О-цепи.

О-цепь отличается вариабельностью у различных грамотрицательных бактерий и определяет гидрофильность молекулы ЛПС. Консервативной и биологически активной частью молекулы ЛПС, является липид А, включающий жирные кислоты, глюкозамин, остатки фосфорной кислоты. С жирными кислотами связана гидрофобность молекулы ЛПС. Особенности химической структуры молекулы ЛПС обусловливают её способность взаимодействовать с гидрофильными компонентами биологических жидкостей и с гидрофобными компонентами мембран клеток. О-цепи соединены с липидом А через core-регион [9].

Биологическая активность ЛПС может изменяться в результате его мономеризации, обусловленной взаимодействием ЛПС с липополисахарид-связывающим белком (lipopolysaccharide-binding protein, LBP), мембранами клеток и/или липопротеинами сыворотки крови [10,11]. Последний структурно подобен бактерицидному белку, повышающему проницаемость мембран (bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)), но функционально отличается от него тем, что в комплексе с ним в отличие от ЛПС-LBP не инициируется синтез цитокинов и других молекул воспаления [12]. ЛПС, связанный с LBP, присоединяет молекулу CD_{14}, происходит взаимодействие комплекса ЛПС-LBP-CD_{14} с трансмембранным TLR_4, завершающегося освобождением и транслокацией в ядро NF-kB, что ведёт к активации генов и индукции провоспалительного каскада [11,13].

Выявлена функциональная связь между уровнями ЛПС и LBP, отражающая активность неадаптивного иммунного ответа в ответ на поступление ЛПС. Определение этих показателей имеет диагностическую ценность.

Сывороточные уровни ЛПС при различных инфекционных заболеваниях и патологических состояниях существенно разнятся. Концентрации ЛПС в сыворотке крови при сальмонеллёзе ниже, чем у здоровых, и снижаются ещё более существенно по мере увеличения тяжести заболевания. При хламидиозе выявлены более высокие значения ЛПС. При внебольничной пневмонии показана сопряжённость уровня сывороточного ЛПС с этиологией и тяжестью заболевания. При полипозном риносинусите концентрация ЛПС в крови обратно коррелирует с продолжительностью заболевания и прямо — с продолжительностью ремиссии. При бактериальном вагинозе выявлено двукратное увеличение средних концентраций ЛПС в крови и зависимость этой величины от длительности существования микробного дисбаланса во влагалище [14].

Нивелирование эффектов ЛПС связывают с образованием антител к О-цепи, но их протективное значение ставится под сомнение. Большую ЛПС-нейтрализующую активность, проявляют антитела (IgG) к детерминантам core-региона ЛПС уровень которых в системном кровотоке взрослых составляет 35-250 MU/мл.

У здоровых людей титр антител к core-региону ЛПС постоянен. Он повышается при массивном поступлении ЛПС в системный кровоток в результате деструкции тканей при травмах, ожогах, острой бактериальной инфекции и др.

При развитии системных воспалительных реакций изменения титра антител к core-региону ЛПС стано-

вятся разнонаправленными, их динамика утрачивает линейный характер. При посттравматическом сепсисе титры IgG и IgM к core-региону ЛПС в первые сутки снижаются с последующим увеличением по мере прогрессирования системной эндотоксинемии. При менингококковой септицемии имеет место постепенное уменьшение содержания сывороточных IgM и IgG к core-региону ЛПС. Выявленные тенденции отражают направление и адекватность протекания иммунных процессов, поэтому показатели антиэндотоксиновых белков могут иметь прогностическое значение в различных клинических ситуациях [15].

При нарастании массивности эндотоксинемии системный воспалительный ответ организма приобретает неконтролируемый характер, что может вести к развитию цитокин-опосредованных патофизиологических реакций и формированию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС), генерализованного феномена Шварцмана; к активации синтеза белков острой фазы, в том числе амилоидного белка и цитопротективных белков теплового шока; активации системы комплемента, развитию гиперлипидемии; эндотоксиновому шоку, полиорганной недостаточности [8,16,17].

Клинически значимые эффекты ЛПС. Представляет интерес обобщение данных, полученных на сложных для изучения объектах: при обследовании пациентов с патологическими и пограничными состояниями – инфекционными заболеваниями бронхолёгочной системы, с хирургической и урологической патологией, беременностью с физиологическим и осложнённым течением гестационного периода.

Нами проведено одно из первых клинических исследований, целью которого явилась оценка роли и степени участия системной эндотоксинемии и ЛПС-индуцированного иммунного ответа в патогенезе внебольничных пневмоний различной степени тяжести. Несмотря на незначимый характер увеличения уровня свободного ЛПС в крови, у больных с тяжёлым течением внебольничной пневмонии грамотрицательной и смешанной бактериальной этиологии имело место достоверное повышение уровня антиэндотоксиновых антител. Повышение сывороточных концентраций антиэндотоксиновых белков – LBP, IgG к core-региону ЛПС, сопряжено с дисбалансом цитокинов (IL-6, TNF-α, при сниженном значении IL-4, IL-2), нарушениями клеточного и гуморального иммунного ответа, определяющими тяжёлое течение пневмоний. Указанные лабораторные показатели состояния антиэндотоксинового иммунитета могут выступать в качестве диагностических маркёров тяжести течения внебольничной пневмонии, и одним из прогностических критериев её исходов [18].

Развитие воспалительных процессов, этиологически связанных с индигенной микробиотой, достаточно часто происходит в биотопах с наибольшей концентрацией микроорганизмов, в первую очередь, в кишечнике. Дистальные отделы кишечника являются локусами относительного стаза, где в условиях замедленного транзита содержимого, включая ЛПС, происходит удлинение времени его контакта со слизистой оболочкой [19]. Эти нарушения актуализируются в послеоперационный период при вмешательствах на органах брюшной полости, когда нарушения целостности и моторно-эвакуаторной функции кишечника становятся наиболее частыми [20]. Это сопряжено с системным ЛПС-опосредованным воспалительным ответом у хирургических больных. Максимальное увеличение эндотоксиновой нагрузки на организм имело место у пациентов с осложнённым течением острого холецистита. Установлена прямая связь между уровнем ЛПС-опосредованной системной эндотоксинемией и способом хирургического вмешательства (открытый или эндоскопический), длительностью операции, возникновением ранних послеоперационных осложнений, что указывает на возможность использования данного показателя для диагностики степени тяжести и осложнений, принятия решений на фоне неотложных состояний в хирургической практике [21]. Показано патогенетическое значение ЛПС в урологии [22].

Для косвенной оценки ЛПС-индуцированных провоспалительных изменений в организме больных с инфекциями, вызванными грамотрицательными бактериями, информативно исследование уровня провоспалительных (IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-a) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов у пациентов со среднетяжёлыми и тяжёлыми формами острых кишечных инфекций, вызванных условно-патогенными представителями *Enterobacteriales*. Выявлено повышение уровня провоспалительных цитокинов в остром периоде болезни и снижение их концентрации до аналогичных значений в контрольной группе в период реконвалесценции. Выявленная динамика цитокинов, относимых к Th_1 типу иммунореактивности, коррелирует с соответствующими изменениями концентрации бактериальных ЛПС в системной гемоциркуляции по мере выздоровления. На протяжении всего заболевания при тяжёлых формах одновременно регистрируются высокие значения показателей противоспалительных цитокинов в плазме крови, что, возможно, сдерживает неконтролируемый провоспалительный каскад, триггером которого часто выступают ЛПС бактерий. Обнаружена прямая корреляция средней силы между оппозиционными группами цитокинов и основными клиническими проявлениями болезни (уровнем лихорадки и симптомами гастроэнтерита) [23].

Проблема ЛПС-обусловленной патологии актуальна для гинекологической практики. Наряду с кишечником, источником ЛПС служит грамотрицательная микробиота влагалища. При бактериальном вагинозе (БВ), наблюдается выраженный дисбаланс вагинальной микробиоты с доминированием облигатно-анаэробных, преимущественно грамотрицательных бактерий. *Prevotella spp.*выделяются от БВ-позитивных женщин в 44% случаев [24].

Патогенетически значимой при БВ является дезинтеграция эпителиальных клеток муциназами и сиалидазами анаэробных бактерий. Связанное с этим повышение проницаемости слизистой оболочки влагалища обеспечивает поступление ЛПС в лимфу и системный кровоток. Надпороговая концентрация

ЛПС в сыворотке крови женщин с БВ составляет Me – 1,4 (0,8-1,6) EU/мл и превышает таковую в группе здоровых женщин в 7 раз (Me – 0,2 (0-0,6) EU/мл). Косвенным свидетельством высвобождения ЛПС в системный кровоток при БВ является 2-кратное увеличение сывороточной концентрации основного фактора врождённого антиэндотоксинового иммунитета – LBP у пациенток с БВ (в сравнении со здоровыми женщинами). Нарастание титра антиэндотоксиновых IgG к core-региону ЛПС в крови при БВ свидетельствует о поступлении ЛПС в системный кровоток [25].

При дисбиозах ЛПС-опосредованные системные реакции не являются критичными, что не исключает возникновения значимых эффектов ЛПС на местном уровне. ЛПС-индуцированные иммунопатологические реакции определяют при БВ отсутствие признаков воспаления вследствие снижения функциональной активности нейтрофилов, проявляющейся незавершённостью фагоцитоза. Это может быть связано с местным воздействием патогенетически значимых концентраций ЛПС или их фракций на лейкоциты, поскольку показано их дозозависимое влияние на основные метаболические эффекты нейтрофилов [8].

На роль микробиоты дистальных отделов репродуктивной системы женщины в качестве источника ЛПС указывают данные о значительном повышении при БВ локальной концентрации ЛПС в цервиковагинальном секрете [26]. Содержание ЛПС в вагинальном секрете женщин с БВ 70-кратно превышает их уровень у женщин с нормоценозом влагалища (3235,0 против 46,4 EU/мл, соответственно). Культуральный лизат *Prevotella bivia* содержит более высокую концентрацию ЛПС (10713,0±306,6 EU/мл) в сравнении с таковым, полученным из культуры *E. coli* (4679,0±585,3 EU/мл) или *Gardnerella vaginalis* (0,07±0,01 EU/мл) [24].

Подтверждают концепцию о дозозависимых эффектах ЛПС при патологических состояниях человека данные об увеличении в крови женщин с БВ уровня ЛПС, ассоциированном с повышением концентрации острофазовых реактантов (С-реактивного белка), определённой тенденцией к снижению количества тромбоцитов, относительным ростом уровня молекул адгезии PECAM-1 и VCAM-1, фазовыми изменениями уровня маркёров эндотелиальной дисфункции (эндотелин-1, фактор Виллебранда) в плазме крови. Реакцию тромбоцитарного звена и эндотелиальных факторов в ответ на поступление ЛПС при вагинальном дисбиозе можно расценить как адаптивную, но потенциально переходящую при наличии неблагоприятных факторов в патологическую [27].

Научно-практический интерес данные о роли ЛПС представляют для акушеров-гинекологов, в частности для понимания сути процессов, наблюдаемых в уникальных трёхкомпонентных системах, к которым можно отнести систему «мать-плацента-плод». Существуют определённые информационные «пробелы» во взглядах на механизмы формирования и поддержания состояния «иммунологической толерантности» материнского организма по отношению к «полуаллогенным» тканям плода. В норме выраженность и направленность иммунных реакций в организме беременной динамически изменяется в зависимости от сроков гестации. Физиологическое течение беременности наряду с различными по интенсивности локальными иммуновоспалительными реакциями на границе раздела «мать-плод» сопровождается слабовыраженным системным воспалением. Сбалансированные в пространстве и времени тонкие иммунные процессы, обеспечивающие физиологическое течение гестации, крайне чувствительны к воздействиям различных неблагоприятных экзо- или эндогенных факторов, среди которых лидируют «инфекционные» [28,29]. Драматические последствия для матери и плода связаны с инфекциями, обусловленными грамотрицательными бактериями.

Для оценки степени участия ЛПС образующих бактерий в патогенезе поздних акушерских осложнений проведено клиническое исследование, включившее в общей сложности 186 беременных во второй половине гестации, у 60 из которых регистрировали физиологическое течение беременности, у 126 – диагностированы «большие акушерские синдромы»: преэклампсия (ПЭ, ранее – гестоз), преждевременные роды (ПР), синдром задержки роста плода (СЗРП) на фоне плацентарной недостаточности (ПН) [30-32].

Патофизиологические механизмы формирования ассоциированных с инфекцией осложнений второй половины гестации полностью не расшифрованы, однако накоплены данные об участии ЛПС бактерий в патобиологии не только ПР [31], СЗРП [33], но и ПЭ [30] – самого грозного акушерского осложнения, напрямую не связанного с инфекционными причинами. Лабораторные маркёры ЛПС представляются в качестве исключительно перспективных лабораторных показателей для мониторинга и ранней диагностики акушерских осложнений.

Экспериментальные исследования C3H/HeJ линий мышей с наличием мутации в TLR_4, у которых после введения ЛПС (*E. coli*) ПР не зарегистрированы ни в одном случае, в отличие от нормальных мышей, среди которых инфузия эндотоксина в 100% случаев вела к развитию ПР, подтверждают значимость ЛПС и TLR_4-зависимых механизмов в генезе ПР [34]. Внутриматочное или интраперитонеальное введение ЛПС в середине гестационного периода инициирует ПР у мышей в течение 24 час [35] через активацию TLR_4 типа, повышение синтеза сигнальных молекул, в т. ч. провоспалительных цитокинов и простагландинов.

У беременных с урогенитальной инфекцией экспрессия TLR_4 в цервикальном эпителии, плаценте, мононуклеарных клетках увеличивается в 2 раза по сравнению со здоровыми женщинами, реализация внутриутробной инфекции сопряжена с 7-кратным увеличением экспрессии TLR_4 в плаценте. Исходя из этого показатели TLR_4 и TLR_2 рассматривают в качестве информативных лабораторных прогностических критериев ПР [36].

Формирование ПН обусловлено нарушением развития плаценты в ранние сроки, изменением морфологической структуры, что ограничивает её функцио-

нальные возможности. Весомым вкладом в развитие ПН и СЗРП является инфекция у матери, наличие которой сопровождается нарушением структуры и функции плаценты. «Посредником» деструктивного действия ЛПС на плаценту считают провоспалительный цитокин IL-1. В пользу этого свидетельствуют результаты опыта с введением рекомбинантного антагониста рецептора IL-1-Ra до инъекции ЛПС, предотвращающее развитие плацентарных нарушений. У животных, которым в период гестации вводился только ЛПС, наблюдалось массивное повреждение ткани плацены [37].

Нарушения в системе гемостаза при беременности в сторону повышения коагуляционного потенциала крови в последующем ведут к тромбозам спиральных артерий, сосудов ворсин, хориальной пластины, сосудов пуповины, что клинически проявляется развитием ПН, гипоксией и гипотрофией плода [38]. Свойство ЛПС запускать коагуляционный каскад, завершающийся тромбообразованием в маточно-плодово-плацентарных сосудах, подтверждено в экспериментах на животных [39].

Нарушение плацентации лежит в основе патогенеза ПЭ, особенно возникающей до 34 нед гестации. В экспериментах *in vitro* показано, что ЛПС ингибируют инвазию клеток трофобласта человека, через усиление продукции провоспалительных цитокинов [30]. При физиологическом течении гестации уровень TLR_4 на клетках трофобласта обеспечивает создание оптимальной локальной иммунной среды на границе раздела «мать-плод» [40], нарушение трофобластической инвазии при ПЭ под воздействием ЛПС увеличивает плотность TLR_4, и как следствие, плацентарной и системной концентрации провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-6, MCP-1. Ведущая этиологическая роль ЛПС в генезе ПЭ подтверждается наличием целого ряда лабораторных моделей ПЭ, где для воспроизведения характерных для данного осложнения симптомов экспериментальным животным использовалось введение ЛПС [30,41]. Патоморфологическая картина в маточно-плацентарных сосудах при развитии ПЭ идентична таковой при атеросклеротическом поражении крупных магистральных сосудов [30,42]. Обсуждается участие ЛПС в патогенезе атеросклероза. ЛПС способен вызывать альтерацию и пролиферацию гладкомышечных и эндотелиальных клеток сосудов, активировать макрофаги интимы артерий, индуцируя их трансформацию в пенистые клетки, перенасыщенные эфирами холестерина, которые активированные макрофаги «забирают» у липопротеинов низкой удельной плотности. Формирование атеросклеротических бляшек с элементами фиброза является следствием пролиферации клеток эндотелия и гладких мышц, активации макрофагов и соединительнотканных элементов [43].

Изменения состава кишечной микробиоты при нормальной гестации достигают «пика» к третьему триместру, когда начинают доминировать *Actinobacteria* и *Proteobacteria*, включающих порядок *Enterobacteriales*. Поскольку избыточная колонизация кишечника микроорганизмами группы *Proteobacteria* наблюдается при развитии воспалительных заболеваний кишечника, можно сделать вывод об увеличении воспалительного потенциала в кишечнике в третьем триместре даже физиологической беременности, что подтверждается повышением концентрации провоспалительных цитокинов в образцах кишечного содержимого, собранного в третьем триместре, по сравнению с ранними сроками гестации [44].

Выраженное относительно физиологического смещение баланса в кишечном микробиоценозе в сторону повышения концентрации грамотрицательных бактерий и их ЛПС ведёт к усилению их транслокации на фоне повышенной проницаемости кишечного эпителия, может инициировать каскад системных иммунопатобиохимичеких реакций, следствием которых может быть манифестация инфекционно-ассоциированных акушерских осложнений: ПР, СЗРП и, вероятно, ПЭ.

Научно-практическое значение ЛПС и обусловленных ими реакций. При различных патологических состояниях наблюдается разнонаправленная модуляция врождённого звена антиэндотоксиновой защиты, что в перспективе позволяет использование антиэндотоксиновых белков, например LBP в качестве одного из показателей вовлеченности и адекватности реакций иммунной системы иммунной системы заболеваниях, этиологически обусловленных грамотрицательными бактериями [14].

Показано положительное влияние ряда фракций ЛПС на основные показатели красной крови при вторичном иммунодефиците, на фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови лабораторных мышей с индуцированным иммунодефицитом [45,46], что ставит ЛПС грамотрицательных бактерий в один ряд с перспективными иммуномодуляторами бактериального происхождения. Показаны биологические эффекты липоарабиноманнана [47], маннанов [48] и др., изменяющие функциональную активность иммунной системы. Установлена выраженная иммуногенная активность деривата ЛПС – монофосфорил-липида А, который исследуется в качестве адъюванта, в том числе для противоопухолевых вакцин [50-55]. В направлении поиска новых иммуномодуляторов бактериальной природы могут появиться значимые перспективы. Наряду с общепринятой точкой зрения о возможности применения иммуномодуляторов в качестве препаратов для коррекции иммунодефитов [56], не исключается их значение в качестве соединений с выраженной на эпигенетическом уровне регуляторной активностью [57].

Анализ данных литературы, результатов научных исследований, проведённых в различных областях медицины, показали важное патогенетическое значение ЛПС в развитии системных воспалительных реакций, системы антиэндотоксиновых белков в качестве регулятора иммунного ответа, определяющей его направленность и адекватность. Детекция эндотоксинемии и косвенных её критериев (мониторинг уровней LBP и BPI) позволит в клинических условиях контролировать степень тяжести патологических и выраженность пограничных процессов, определять состояние

иммунной реактивности, её достаточность или гипо/гиперреактивность, оценить прогноз заболеваний. С учётом доказанной иммуномодулирующей активности ЛПС перспективна разработка специфических вакцин и препаратов на их основе.

Приведённые выше данные могут составить доказательную базу для положений, указывающих на роль бактериальных ЛПС в развитии ряда неинфекционных заболеваний, включающих сердечно-сосудистую патологию, атеросклероз [1,43], «метаболические инфекции» [3], нейродегенеративные заболевания [58], депрессию [59], старение [60], что позволит преодолеть «Серьёзные проблемы, с которыми мы сталкиваемся и которые нельзя решить на том же уровне мышления, на котором они возникли» (А.Эйнштейн), в том числе и для решения прикладных задач клинической лабораторной диагностики.

Финансирование. *Отдельные фрагменты работы выполнены при финансовой поддержке фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «УМНИК ХЕЛСНЕТ НТИ»-2017, Москва.*

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 9-13, 15, 17, 24, 26, 29-42, 44, 47-60 см. REFERENCES)

1. Покусаева Д.П., Аниховская И.А., Коробкова Л.А., Яковлев М.Ю., Энукидзе Г.Г. Прогностическая значимость показателей системной эндотоксинемии в атерогенезе. *Физиология человека*. 2019; 45(5): 99-109.
4. Яковлев М.Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека. *Физиология человека*. 2003; 29(4): 98-109.
5. Уразаев Р.А. Крупник А.Н., Яковлев М.Ю. Эндотоксинемия в раннем периоде адаптации новорожденных и их матерей. *Казанский медицинский журнал*. 1992; 2: 114-8.
6. Аниховская И.А., Белоглазов В.А., Гордиенко А.И., Иванов Ю.Д., Кубышкин А.В., Маркелова М.М. с соавт. Краткая история изучения роли кишечного фактора в старении и/или индукции системного воспаления: достижения, проблемы, перспективы. *Патогенез*. 2019; 7(17): 4-17.
7. Подопригора Г.И., Кафарская Л.И., Байнов Н.А., Шкопоров А.Н. Бактериальная транслокация из кишечника: микробиологические, иммунологические и патофизиологические аспекты. *Вестник РАМН*. 2015; 70(6): 640-50.
8. Рябиченко Е.В., Веткова Л.Г., Бондаренко В.М. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2004, 3: 98-105.
14. Мавзютов А.Р., Мавзютова Г.А., Бондаренко К.Р., Сендерович С.Е., Назмутдинова Р.Г., Мурзабаева Р.Т. с соавт. Характер изменений уровня липополисахарид-связывающего белка при различных инфекционных процессах и дисбиозах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 2: 66-72.
16. Бондаренко В.М., Гинцбург А.Л., Лиходед В.Г. Роль инфекционного фактора в патогенезе атеросклероза. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2011; 1: 7-12.
18. Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Мавзютов А.Р., Хайруллина Р.М., Акбашева А.О., Кузовкина О.З. Состояние антиэндотоксиновой защиты при внебольничной пневмонии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2010; 4: 65-71.
19. Микробиология и иммунология: учебник. Воробьёв А.А., ред. Издание второе, перераб. и доп. М.: Медицина; 2005.
20. Соловьев И.А., Колунов А.В. Послеоперационный парез кишечника – проблема абдоминальной хирургии. *Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова.* 2013; 8(2): 112-8.
21. Тимербулатов М.В., Хафизов Т.Н., Мавзютов А.Р., Сендерович Е.И., Хафизов Р.Р., Адгамова А.Л. Влияние хирургического доступа на уровень эндотоксинемии. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова.* 2013; 1: 39-42.
22. Мавзютов А.Р. Грамотрицательные бактерии и воспаление в урологии: молекулярные механизмы. В кн.: Глыбочко П.В., Коган М.И., Набока Ю.Л., ред. *Инфекции и воспаления в урологии*. М.: МЕДФОРУМ. 2019: 35-52.
23. Дубровская Д.Н., Мурзабаева Р.Т., Мавзютов А.Р. Клинико-патогенетическое значение цитокинов при острых кишечных инфекциях, вызванных условно-патогеннымиэнтеробактериями у взрослых. *Вестник Башкирского государственного медицинского университета*. 2013; 4: 200-6.
25. Мавзютов А.Р., Бондаренко К.Р., Бондаренко В.М. Эндотоксинемия и антиэндотоксиновый иммунитет у женщин при бактериальном вагинозе. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2009; 5: 57-61.
27. Гильманов А.Ж., Мавзютов А.Р., Ахмадуллина Ю.А., Гайсина Ю.Р., Идрисова Г.А. Эндотоксинемия и функциональные особенности тромбоцитов и эндотелия у женщин с вагинальным дисбиозом. *Вестник Башкирского государственного медицинского университета.* 2012; 2: 89-96.
28. Макаров О.В., Бахарева И.В., Ганковская Л.В., Романовская В.В., Ганковская О.А. Toll-подобные рецепторы в генезе невынашивания беременности. *Акушерство и гинекология*. 2008; 2: 22-8.
43. Бондаренко В.М., Гинцбург А.Л., Лиходед В.Г. *Микробный фактор и врожденный иммунитет в патогенезе атеросклероза.* Москва-Тверь: Триада; 2013.
45. Мавзютов А.Р., Князева О.А., Гарафутдинов Р.Р., Габдрахманова А.Р. Влияние липополисахарида Escherichia coliна фагоцитарную и метаболическую активность нейтрофилов крови мышей с индуцированным иммунодефицитом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.*2017; 3: 84-90.
46. Мавзютов А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Габдрахманова А.Р., Салахов И.М., Тупиев И.Д. Липополисахарид *Sinorhizobiummeliloti* стимулирует гемопоэз привторичном иммунодефиците в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(3): 20-8.

REFERENCES

1. Pokusaeva D.P., Anikhovskaya I.A., Korobkova L.A., Yakovlev M.Yu., Enukidze G.G. Prognostic significance of systemic endotoxinemia in atherogenesis. *Fiziologiya cheloveka*. 2019; 45(5): 99-109.(in Russian)
2. Shukla S.D., Budden K.F., Neal R., Hansbro P.M. Microbiome effects on immunity, health and disease in the lung. *Clin Transl Immunology*. 2017; 6(3): e133. doi: 10.1038/cti.2017.6. eCollection 2017 Mar.
3. Gomes A.C., Bueno A.A., de Souza R.G., Mota J.F. Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutr J*. 2014;13:60.
4. Yakovlev M.Yu. Elements of the endotoxin theory of physiology and human pathology. *Fiziologiya cheloveka*. 2003; 29(4): 98-109. (in Russian)
5. Urazaev R.A. Krupnik A.N., Yakovlev M.Yu. Endotoxinemia in the early period of adaptation of newborns and their mothers. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 1992; 2: 114-8. (in Russian)
6. Anikhovskaya I.A., Beloglazov V.A., Gordienko A.I., IvanovYu.D., Kubyshkin A.V., Markelova M.M. et al. A brief history of the study of the role of the intestinal factor in aging and/or the induction of systemic inflammation: achievements, problems, prospects. *Patogenez*. 2019; 7(17): 4–17. (in Russian)
7. Podoprigora G.I. Kafarskaya L.I. Bainov N.A. Shkoporov A.N. Bacterial translocation from the intestine: microbiological, immunological and pathophysiological aspects. *Vestnik RAMN*. 2015; 70(6): 640-50. (in Russian)

8. Ryabichenko E.V., Vetkova L.G., Bondarenko V.M. Molecular aspects of the damaging effects of bacterial lipopolysaccharides. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2004, 3: 98-105. (in Russian)
9. Erridge C., Bennett-Guerrero E., Poxton I.R. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect*. 2002; 4(8): 837-51.
10. Schumann R., Leong S.R., Flaggs G.W., Gray P.W., Wright S.D., Mathison J.C. et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 1990; 249: 1429–31.
11. Weiss J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochem. Soc. Trans*. 2003; 31(4): 785–90.
12. Krasity B.C., Troll J.V., Weiss J.P., McFall-Ngai M.J. LBP/BPI proteins and their relatives: conservation over evolution and roles in mutualism. *Biochem.Soc. Trans*. 2011; 39(4): 1039-44.
13. Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S. Ulevitch R.J., Mathison J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990; 249: 1431-3.
14. Mavzyutov A.R., Mavzyutova G.A., Bondarenko K.R., Senderovich S.E., Nazmutdinova R.G., Murzabaeva R.T. et al. The nature of changes in the level of lipopolysaccharide-binding protein in various infectious processes and dysbiosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2011; 2: 66-72. (in Russian)
15. Barclay G.R. Endogenous endotoxin-core antibody (Endo-CAb) as a marker of endotoxin exposure and a prognostic indicator: a review. *Prog. Clin. Biol. Res*. 1995; 392: 263-72.
16. Bondarenko V.M., Gunzburg A.L., Likhoded V.G. The role of the infectious factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni*. 2011; 1: 7-12. (in Russian)
17. Medzhitov R., JanewayC.Jr. Innate immunity. *N. Engl. J. Med*. 2000; 343: 338–44.
18. Mavzyutova G.A., Fazlyeva R.M., Mavzyutov A.R., Khayrullina R.M., Akbasheva A.O., Kuzovkina O.Z. The state of antiendotoxin protection in community-acquired pneumonia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2010; 4: 65-71. (in Russian)
19. Microbiology and immunology: a textbook [Mikrobiologiya i immunologiya: uchebnik]. Vorob'yov A.A., ed. 2nd ed. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
20. Solov´yev I.A., Kolunov A.V. Postoperative intestinal paresis is a problem of abdominal surgery. *Vestnik Natsional'nogo medikokhirurgicheskogo tsentra im. N.I. Pirogova*. 2013; 8(2): 112-8. (in Russian)
21. Timerbulatov M.V., Khafizov T.N., Mavzyutov A.R., Senderovich E.I., Khafizov R.R., Adgamova A.L. The effect of surgical access on the level of endotoxinemia. *Khirurgiya. Zhurnalim. N.I. Pirogova*. 2013; 1: 39-42. (in Russian)
22. Mavzyutov A.R. Gram-negative bacteria and inflammation in urology: molecular mechanisms. Glybochko P.V., Kogan M.I., NabokaYu.L., eds. *Infektsii I vospaleniya v urologii*. Moscow: Medforum; 2019: 35-52. (in Russian)
23. Dubrovskaya D.N., Murzabaeva R.T., Mavzyutov A.R. Clinical and pathogenetic significance of cytokines in acute intestinal infections caused by opportunistic enterobacteria in adults. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta.* 2013; 4: 200-6. (in Russian))
24. Aroutcheva A., Ling Z., Faro S. Prevotellabivia as a source of lipopolysaccharide in the vagina. *Anaerobe*. 2008; 14(5): 256-60.
25. Mavzyutov A.R., Bondarenko K.R., Bondarenko V.M. Endotoxinemia and antiendotoxin immunity in women with bacterial vaginosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2009; 5: 57-61. (in Russian)
26. Platz-Christensen J.J., Mattsby-Baltzer I., Thomsen P., Wiqvist N. Endotoxin and interleukin-1 alpha in the cervical mucus and vaginal fluid of pregnant women with bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1993; 169: 1161-6.
27. Gilmanov A.Zh., Mavzyutov A.R., Akhmadullina Yu.A., Gaysina Yu.R., Idrisova G.A. Endotoxinemia and functional characteristics of platelets and endothelium in women with vaginal dysbiosis. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta.* 2012; 2: 89-96. (in Russian)
28. Makarov O.V., Bakhareva I.V., Gankovskaya L.V., Romanovskaya VV, Gankovskaya O.A. Toll-like receptors in the genesis of miscarriage. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2008; 2: 22-8. (in Russian)
29. Lamont R.F. Advances in the Prevention of Infection-Related Preterm Birth. *Front Immunol*. 2015; 6: 566. doi: 10.3389/fimmu.2015.00566.
30. Kell D.B., Kenny L.C. A Dormant Microbial Component in the Development of Preeclampsia. *Front Med (Lausanne)*. 2016;3:60.
31. Romero R., Dey S.K., Fisher S.J. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science.* 2014; 345(6198):760-5.
32. Brosens I., Pijnenborg R., Vercruysse L., Romero R. The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2011;204(3):193-201.
33. Dai Y., Diao Z., Sun H, Li R., Qiu Z., Hu Y. MicroRNA-155 is involved in the remodeling of human-trophoblast-derived HTR-8/SVneo cells induced by lipopolysaccharides . *Hum Reprod* . 2011; 26 :1882-91.
34. Wang H., Hirsch E. Bacterially-induced preterm labor and regulation of prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of toll-like receptor 4. *BiolReprod.* 2003;69(6):1957-63.
35. Bizargity P., Del Rio R., Phillippe M., Teuscher C., Bonney E.A. Resistance to lipopolysaccharide-induced preterm delivery mediated by regulatory T cell function in mice. *Biol. Reprod*. 2009; 80(5):874-81.
36. Kim Y.M., Romero R., Chaiworapongsa T., Kim G.J., Kim M.R., Kuivaniemi H. et al. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am. J. Obstet Gynecol.* 2004; 191: 1346-55.
37. Girard S., Tremblay L., Lepage M., Sébire G. IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. *J. Immunol*. 2010; 184(7): 3997-4005.
38. Levi M., Dörffler-Melly J., Reitsma P., Buller H., Florquin S., van der Poll T., Carmeliet P. Aggravation of endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation and cytokine activation in heterozygous protein-C-deficient mice. *Blood.* 2003; 101(12): 4823-7.
39. Hurley J.C. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin. Microbiol. Rev*. 1995, 8(2): 268-92.
40. Ma Y., Mor G., Abrahams V.M., Buhimschi I.A., Buhimschi C.S., Guller S. Alterations in syncytiotrophoblast cytokine expression following treatment with lipopolysaccharide. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2006; 55:12-8.
41. van der Graaf A.M., Wiegman M.J., Plösch T., Zeeman G.G., van Buiten A., Henning R.H. et al. Endothelium-dependent relaxation and angiotensin II sensitivity in experimental preeclampsia. *PLoS One.* 2013; 8(11): e79884.
42. Rustveld L.O., Kelsey S.F., Sharma R. Matern Child Health J. Association between maternal infections and preeclampsia: a systematic review of epidemiologic studies. *Matern. Child Health J*. 2008; 12(2): 223-42.
43. Bondarenko V.M., Gunzburg A.L., Likhoded V.G. Microbial factor and innate immunity in the pathogenesis of atherosclerosis [Mikrobnyi factor I vrozhdennyi immunitet v patogeneze ateroskleroza]. Moscow-Tver´:Triada; 2013. (in Russian)
44. Koren O., Goodrich J.K., Cullender T.C., Spor A., Laitinen K., Bäckhed H.K. et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell.* 2012;150(3): 470-80.
45. Mavzyutov A.R., Knyazeva O.A., Garafutdinov R.R., Gabdrakhmanova A.R. Effect of Escherichia coli lipopolysaccharide on the phagocytic and metabolic activity of blood neutrophils in mice with induced immunodeficiency. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2017; 3: 84-90. (in Russian)

46. Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R., Gabdrakhmanova A.R., Salakhov I.M., Tupiev I.D. *Sinorhizobiummeliloti* lipopolysaccharide stimulates hematopoiesis in secondary immunodeficiency in the experiment. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(3): 20-8. (in Russian)
47. Angala S.K., McNeil M.R., Shi L., Joe M., Pham H., Zuberogoitia S. et al. Biosynthesis of the Methylthioxylose Capping Motif of Lipoarabinomannan in *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol.* 2017;12(3): 682-91.
48. Chauhan P.S., Gupta N. Insight into microbial mannosidases: a review. *Crit. Rev. Biotechnol*. 2017; 37(2): 190-201.
49. Alshamsan A. Nanotechnology-Based Cancer Vaccine. *Methods Mol. Biol.* 2017;1530: 257-70.
50. Barati N., Nikpoor A.R., Razazan A., Mosaffa F., Badiee A., Arab A. et al. Nanoliposomes carrying HER2/neu-derived peptide AE36 with CpG-ODN exhibit therapeutic and prophylactic activities in a mice TUBO model of breast cancer. *Immunol. Lett*. 2017; 190: 108-17.
51. Iwasaki T., Hirano T., Kodama S., Kadowaki Y., Moriyama M., Kawano T. et al. Monophosphoryl lipid A enhances nontypeable-Haemophilusinfluenzae-specific mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 2017; 97:5-12.
52. Watts B.A., George T., Sherwood E.R., Good D.W. Monophosphoryl lipid A induces protection against LPS in medullary thick ascending limb through a TLR4-TRIF-PI3K signaling pathway. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2017; 313(1):F103-F115.
53. Fensterheim B.A., Guo Y., Sherwood E.R., Bohannon J.K. The Cytokine Response to Lipopolysaccharide Does Not Predict the Host Response to Infection. *J. Immunol*. 2017;198(8): 3264-73.
54. Klimek L., Schmidt-Weber C.B., Kramer M.F., Skinner M.A., Heath M.D. Clinical use of adjuvants in allergen-immunotherapy. *Expert Rev. Clin. Immunol*. 2017;13(6): 599-610.
55. Mohammadi-Shahrokhi V., Rezaei A., Andalib A., Rahnama A., Jafarzadeh A., Eskandari N. Immunomodulatory Effects of Adjuvants CPG, MPLA, and BCG on the Derp2-Induced Acute Asthma at Early Life in an Animal Model of BALB/c Mice. *Inflammation.* 2017;40(1): 259-74.
56. Bolhassani A., Talebi S., Anvar A. Endogenous and Exogenous Natural Adjuvants for Vaccine Development. *Mini. Med. Chem*. 2017; 17(15): 1442-56.
57. Grabiec A.M., Potempa J. Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases. *Crit. Rev. Microbiol*. 2017; 3: 1-15.
58. Zhao Y., Cong L., Jaber V., Lukiw W.J. Microbiome-Derived Lipopolysaccharide Enriched in the Perinuclear Region of Alzheimer's Disease Brain. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:1064.
59. Foster J.A., McVey Neufeld K.A. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Cell.* 2013;36: 305–12.
60. Baylis D., Bartlett D.B., Patel H.P., Roberts H.C. Understanding how we age: insights into inflammaging. *Longev Healthspan.* 2013; 2(1): 8.

Поступила 11.11.19
Принята к печати 20.11.19

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-37-41

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Шипицына И. В., Осипова Е. В., Овчинников Е. Н., Леончук Д. С.

ЗАВИСИМОСТЬ БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ОТ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA,* ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени акад. Г. А. Илизарова» Минздрава РФ, 640014, Курган, Россия

В связи с распространением высокорезистентных штаммов среди клинически значимых клонов P. aeruginosa возникает необходимость назначать антибиотики не только с учётом знания спектра чувствительности конкретного изолята, но и данных биоплёночной активности микроорганизма.

Цель – исследовать зависимость биоплёнкообразующей способности от чувствительности к антибактериальным препаратам клинических штаммов P. aeruginosa, выделенных от пациентов с хроническим остеомиелитом. Обследовано 36 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей старше 18 лет, находившихся на лечении в центре гнойной остеологии. Объект исследования – материал из ран, свищей, очага воспаления. Проанализирована чувствительность выделенных микроорганизмов к 10 антибиотикам: пиперациллин/тазобактам, имипенем, меропенем, азтреонам, амикацин, ципрофлоксацин, цефтриаксон, цефтазидим, цефотаксим, цефепим. Среди клинических изолятов P. aeruginosa, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей, высоко- и среднеадгезивные штаммы составили 86,1%. Высокоадгезивные штаммы устойчивы к широкому спектру антибактериальных препаратов, применяемых в клинике. При анализе антибиотикограмм, полученных для высокоадгезивных штаммов, наиболее эффективны пенициллины, для среднеадгезивных штаммов – пенициллины, аминогликозиды, карбапенемы, для низкоадгезивных – аминогликозиды, пенициллины, карбапенемы, монобактамы, хинолоны. Мультирезистентность P. aeruginosa является серьёзной проблемой в лечении пациентов с хроническим остеомиелитом. Распространение антибиотикорезистентных штаммов P. aeruginosa связано с существованием бактерий в составе биоплёнки. Поскольку адгезия – первый этап в формировании биоплёнки, важно своевременно выявлять штаммы, обладающие высоким адгезивным потенциалом.

Ключевые слова: *хронический остеомиелит: синегнойная инфекция; биоплёнки; адгезия; антибиотикорезистентность.*

Для цитирования: *Шипицына И. В., Осипова Е. В., Овчинников Е. Н., Леончук Д. С. Зависимость биопленкообразующей способности от антибиотикочувствительности клинических штаммов Pseudomonas aeruginosa, выделенных у пациентов с хроническим остеомиелитом. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1):37-41*

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-37-41

Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Ovchinnikov E. N., Leonchuk D. S.

DEPENDENCE OF BIOFILM-FORMING ABILITY ON THE ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS

Federal State Budgetary Institution *Russian Ilizarov Scientific Centre «Restorative Traumatology and Orthopaedics»* of the RF Ministry of Health, Kurgan, Russian Federation, 640014

Due to the spreading highly resistant strains among clinically significant P. aeruginosa clones, it becomes necessary to prescribe antibiotics not only taking into account the knowledge of sensitivity spectrum of a particular isolate but the data of microorganism biofilm activity as well. To study the dependence of biofilm-forming ability on the sensitivity to antibacterial preparations of P. aeruginosa clinical strains, isolated from patients with chronic osteomyelitis. 36 patients above 18 with chronic osteomyelitis of long tubular bones who were treated in the center of purulent osteology took part in the experiment. Object of the study – material isolated from wounds, fistulas, as well as from inflammatory foci. The sensitivity of isolated microorganisms to 10 antibiotics was analyzed: Piperacillin/Tazobactam, Imipenem, Meropenem, Aztreonam, Amikacin, Ciprofloxacin, Ceftriaxone, Ceftazidime, Cefotaxime, Cefepime.

High- and medium-adhesive strains accounted for 86,1 % among P. aeruginosa clinical isolates, obtained from the wounds of patients with chronic osteomyelitis of long tubular bones. Highly adhesive strains are resistant to a wide range of antibacterial preparations used clinically. Penicillins were the most effective preparations when analyzing antibioticograms obtained for highly adhesive strains, for medium adhesive strains – penicillins, aminoglycosides and carbapenems, for low adhesive ones – aminoglycosides, penicillins, carbapenems, monobactams, quinolones. P. aeruginosa multi-resistance is a serious problem in the treatment of patients with chronic osteomyelitis. Spreading antibiotic-resistant strains of P. aeruginosa is associated with the presence of bacteria in the biofilm. Since adhesion is the first step in the biofilm formation, it is important to identify strains having high adhesive ability timely.

Keywords: *chronic osteomyelitis; P. aeruginosa (pyocyanic) infection; biofilms; adhesion; antibiotic resistance.*

Для корреспонденции: *Шипицына Ирина Владимировна*, канд. биол.наук, науч. сотр. научно-клинической лаб. микробиологии и иммунологии; e-mail: ivschimik@mail.ru

RUSSIAN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS. 2020; 65(1)
DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-37-41

For citation: *Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Ovchinnikov E. N., Leonchuk D. S. Dependence of biofilm-forming ability on the antibiotic sensitivity of Pseudomonas aeruginosa clinical strains isolated from patients with chronic osteomyelitis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (1): 37-41. (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-37-41*

For correspondence*: Shipitsyna I.V.,* Ph.D. of Biological Sciences; e-mail: IVSchimik@mail.ru

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

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 29.10.2019
Accepted 06.11.2019

Введение. В этиологии остеомиелита возросла роль грамотрицательной микрофлоры, высокорезистентной к антибактериальным препаратам, применяемых в клинике [1, 2]. Особое место среди возбудителей остеомиелита занимает *Pseudomonas aeruginosa* – грамотрицательная бактерия, имеющая многочисленные факторы вирулентности: пили, флагелярные протеины, липид А, экзо- и эндотоксины, пиоцианин, эластазу и др. [3, 4]. Сложной системой защиты *P. aeruginosa* от иммунной атаки организма является образование биоплёнок [5, 6]. *P. aeruginosa* может формировать недифференцированную или дифференцированную биоплёнку [3]. Внеклеточный матрикс *P. aeruginosa* формируют за счёт собственных полимеров, для построения матрикса *in vivo* бактерия активно использует биополимеры хозяина (фибрин, секреты слизистых оболочек, тканевые дериваты) [3, 6]. Данные о биоплёночный активности *P. aeruginosa* разнятся. Большинство исследователей сходятся во мнении, что лишь малая часть изолятов *P. aeruginosa* не являются биоплёночными. Основная масса активно формируют биоплёнку на различных поверхностях [2, 3]. Существование бактерий в составе биоплёнок способствует снижению эффективности антибактериальной терапии [7, 8].

Согласно рекомендациям «Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам — EUCAST» для лечения инфекции, ассоциированной с *P. aeruginosa,* могут использоваться ампициллин, амоксициллин, цефазолин, цефотаксим, цефтриаксон, эртапенем, канамицин, неомицин, тетрациклины, тигециклин, триметоприм, триметоприм/сульфаметоксазол. Увеличение доли резистентных штаммов среди клинически значимых клонов *P. aeruginosa* ведёт к необходимости, при назначении антибиотиков, учитывать не только спектр чувствительности конкретного изолята, но и его биоплёночную активность.

Цель – исследовать чувствительность к антибактериальным препаратам клинически значимых штаммов *P. aeruginosa*, выделенных у пациентов с хроническим остеомиелитом, в зависимости от их биоплёнкообразующей способности.

Материал и методы. Обследовано 36 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей старше 18 лет, находившихся на лечении в центре гнойной остеологии города. Объект исследования – материал из ран, свищей, очага воспаления.

Идентификацию микроорганизмов и определение антибиотикочувствительности проводили с помощью бактериологического анализатора WalkAway-40 Plus («Siemens», США). При характеристике антибиотикочувствительности микроорганизмов использовали общепринятые показатели: «чувствительные» (S), «умеренно резистентные» (I), «резистентные» (R) штаммы. Проанализирована чувствительность выделенных микроорганизмов к пиперациллину/тазобактаму, имипенему, меропенему, азтреонаму, амикацину, ципрофлоксацину, цефтриаксону, цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму.

Биоплёнкообразующую способность выделенных штаммов (n=36) изучали с помощью унифицированной ранее методике [9]. Для интерпретации полученных данных использованы внутрилабораторные критерии, разработанные на основе рекомендаций S.Stepanovic и соавт. [10]. При значениях OD_{630} (оптическая плотность красителя при длине волны 630 нм) ниже 0,090 – у штаммов отсутствует способность к образованию биоплёнки; $0{,}090<OD_{630}\leq 0{,}180$ – слабая; $0{,}180<OD_{630}\leq 0{,}360$ – средняя; $OD_{630}\leq 0{,}360$ – высокая способность к образованию биоплёнки.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения анализа данных AtteStat, версия 13.0 [11]. Данные представлены в виде медианы (Me), 25% и 75% квартилей (Q_{25}-Q_{75}). Для проверки гипотезы нормальности распределения в выборках использовали критерий Шапиро-Уилка. Значимость различий между группами проверяли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Различия между группами наблюдений считали статистически значимыми при $p<0{,}05$.

Результаты и обсуждение. Все штаммы *P. aeruginosa,* выделенные из патологического материала у пациентов с хроническим остеомиелитом, обладали адгезивными свойствами. Уровень биоплёнкообразования на поверхности полистирола различен: у 31% изолятов отмечено высокое сродство к плёнкообразованию, у 56% – средний уровень, у 13% – низкий.

Биоплёнкообразующая способность высокоадгезивных штаммов через 24 ч составляла 0,412 (0,372; 0,450) ед. опт. пл, через 48 ч – 0,435 (0,399; 0,461) ед. опт. пл. (рис. 1). Уровень плёнкообразования среднеадгезивных штаммов через 24 ч составил 0,239 (0,212; 0,267) ед.опт.пл., через 48 ч – 0,250 (0,240; 0,294) ед.опт.пл. Средняя оптическая плотность низкоадгезивных штаммов через сутки достигла отметки 0,130 (0,113; 0,150) ед. опт. пл., через 48 ч – 0,147 (0,139; 0,157) ед.опт.пл.

Установлены различия в чувствительности к антибактериальным препаратам, зависящей от способности к биоплёнкообразованию. Низкая чувствительность к цефалоспоринам (63,6% устойчивых штам-

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-37-41

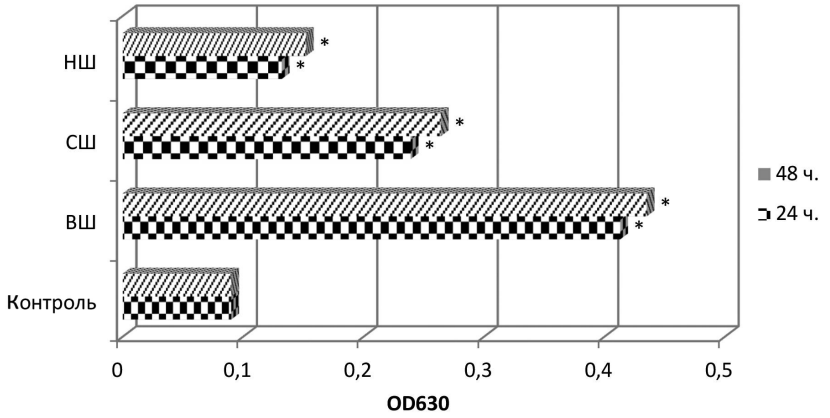


Рис. 1. Биоплёнкообразующая активность (OD_{630}) штаммов *P. aeruginosa* через 24 ч и 48 ч, выраженная в ед. опт. пл.
НШ – низкоадгезивные штаммы; СШ – среднеадгезивные штаммы; ВШ – высокоадгезивные штаммы; * – различия значимы по сравнению с контрольными значениями при $p<0,05$.

Рис. 2 Чувствительность штаммов *P. aeruginosa,* обладающих высоким сродством к биоплёнкообразованию.
Здесь и на рис. 3,4: R-резистентный штамм; S – чувствительный штамм; I – умеренно-резистентный штамм.

мов к цефтазидиму, 54,5% – цефотаксиму, 81,8% – цефтриаксону, 63,5% – цефепиму), аминогликозидам (54,5% устойчивых штаммов к гентамицину, 54,6% – к амикацину), монобактамам (45,4% резистентных к азтреонаму штаммов), хинолонам (81,8% резистентных к ципрофлоксацину штаммов) характерна для штаммов, активно формирующих биоплёнку. Карбапенемы проявляли среднюю активность: 36,4% и 27,3% устойчивых штаммов к имипенему и меропенему соответственно. Наиболее эффективный препарат в отношении высокоадгезивных штаммов *P. aeruginosa* пиперациллин/тазобактам (9,1% устойчивых штаммов) (рис. 2).

В отношении штаммов со средней биоплёнкообразующей способностью эффективны пиперациллин/тазобактам, цефтриаксон, азтреонам, амикацин, имипенем, меропенем (5; 5; 5; 25; 25, 15% устойчивых штаммов соответственно) (рис. 3).

Аминогликозиды, карбапенемы, пенициллины проявляли 100% эффективность в отношении низкоадгезивных штаммов *P. aeruginosa*. Среди цефалоспоринов наименьшую активность проявляли цефотаксим (40% устойчивых штаммов) и цефтриаксон (40% устойчивых штаммов). Цефепим и цефтазидим активны в отношении 80% штаммов (рис. 4).

Против высокоадгезивных штаммов наиболее эффективны карбапенемы, пенициллины, для среднеадгезивных штаммов – пенициллины, аминогликозиды, карбапенемы, для низкоадгезивных – аминогликозиды, пенициллины, карбапенемы, монобактамы, хинолоны и ряд цефалоспоринов.

Высокоадгезивные штаммы *P. aeruginosa* обладали множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам.

P. aeruginosa относится к условно-патогенным микроорганизмам и может вызывать инфекционный процесс, преимущественно, на фоне иммуносупрессии [7, 12, 13]. В этиологической структуре хронического остеомиелита *P. aeruginosa* наряду с *Staphylococcus aureus* занимает лидирующие позиции [1, 2]. Трудность лечения и диагностики синегнойной инфекции обусловлена наличием широкого спектра факторов патогенности

Рис. 3. Чувствительность среднеадгезивных штаммов P. *aeruginosa* к антибактериальным препаратам.

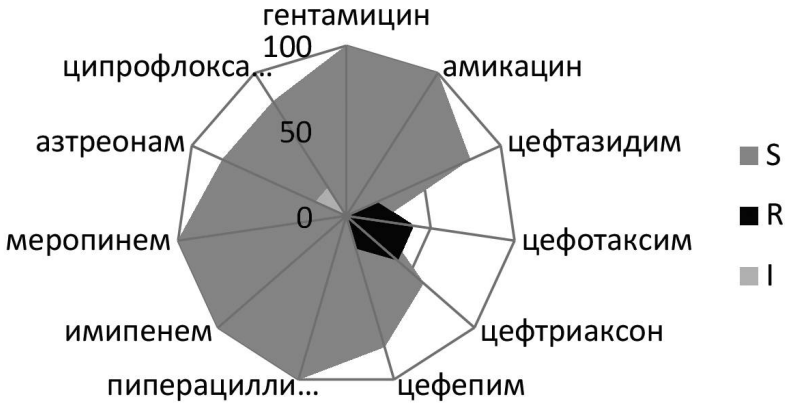


Рис. 4. Чувствительность низкоадгезивных штаммов *P. aeruginosa* к антибактериальным препаратам.

и локализацией бактерий в глубоких слоях тканей, а не на поверхности ран [4, 14]. Одним из механизмов защиты против иммунной системы организма, является нахождение бактерии в составе биоплёнки [5, 7, 15]. Такая форма жизни делает её недоступной для многих антибактериальных препаратов. Карбапенем, активный в отношении планктонных форм *P. aeruginosa,* в случае сформированной биоплёнки, не является эффективным. Вследствие использования при лечении антибактериальных препаратов, плохо проникающих в биоплёнку, появляются мультирезистентные штаммы, что ведёт к возникновению рецидивов заболевания и формированию очагов хронических процессов [3, 6].

Лечение инфекции, ассоциированной с биоплёночными формами P. *aeruginosa*, направлено на выявление и разрушение биоплёнки на различных этапах её формирования [3, 5, 7]. Предложено комбинированное использование нескольких антибиотиков (тобрамицина, ципрофлоксацина, тетрациклина, колистина), синергидное действие которых направлено на разрушение активных и неактивных клеток биоплёнки [16].

Выводы. Высоко- и среднеадгезивные штаммы составляли 86,1% клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей. Высокоадгезивные штаммы устойчивы к широкому спектру антибактериальных препаратов, применяемых в клинике. Наиболее эффективные в отношении высокоадгезивных штаммов *P. aeruginosa* препараты – пиперациллин/тазобактам; среднеадгезивных штаммов – пиперациллин/тазобактам, цефтриаксон, азтреонам, меропенем; низкоадгезивных – пиперациллин/тазобактам, амикацин, гентамицин, имипенем, меропенем, ципрофлоксацин, азтреонам, цефепим, цефтазидим.

Мультирезистентность *P. aeruginosa* является серьёзной проблемой в лечении пациентов с хроническим остеомиелитом. Распространение антибиотикорезистентных штаммов *P. aeruginosa* связано с существованием бактерий в составе биоплёнки. Лечение синегнойной инфекции требует назначения препаратов с учётом спектра чувствительности конкретного изолята, и с учётом оценки эффективности его дей-

ствия на биоплёночные формы возбудителя. Поскольку адгезия – первый этап в формировании биоплёнки, важно своевременно выявлять штаммы, обладающие высоким адгезивным потенциалом.

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

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-7, 10, 12, 13, 16 см. REFERENCES)

1. Булавкин В.П., Окулич В.К., Конопелько Е.А. Антибактериальная терапия хронического остеомиелита длинных трубчатых костей. *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2000; (3): 48-53.
2. Шипицына И.В., Осипова Е.В., Науменко З.С. Исследование факторов персистенции: биоплёнкообразующей способности и антилизоцимной активности этиологических агентов хронического остеомиелита. *Инфекции в хирургии.* 2014; 12(2): 40-2.
3. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2015; 17(3): 170-86.
4. Воронина О.Л., Кунда М.С., Аветисян Л.Р. и соавт. Особенности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих госпитальные инфекции у пациентов хирургических отделений ФНЦТИО им. В.И. Шумакова. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012; 14(2): 88-9.
8. Илюкевич Г. В. Синегнойная инфекция: в новый век со старой проблемой. *Медицинские новости*. 2004. (12): 3-8.
9. Осипова Е.В., Шипицына И.В. Исследование адгезивных характеристик уропатогенных штаммов *Escherichia coli* у пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой. *Урология.* 2014; (2): 20-4.
11. Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. СПб.: БХВ-Петербург; 2004.
14. Мележик И.А., Яворская Н.В, Шепелевич В.В., Кокозей В.Н. Роль биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* в развитии эндогенных инфекций. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН* (электронный журнал). 2013; 3.
15. Осипова Е.В., Шипицына И.В. Информационная характеристика микробных биоплёнок, формируемых *in vitro* на поверхности покровного стекла клиническими штаммами *Klebsiella pneumoniae*. *Гений ортопедии.* 2018; 24(4): 478-81.

REFERENCES

1. Bulavkin V.P., Okulich V.K., Konopelko E.A. Antibacterial therapy of chronic osteomyelitis of long tubular bones. *Immunopatologiya, Allergologiya, Infektologiya.* 2000; 3: 48-53. (in Russian)
2. Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Naumenko Z.S. The study of persistence factors: biofilm-forming ability and antilysocyme activity of chronic osteomyelitis etiologic agents. *Infektsii v khirurgii.* 2014; 12(2): 40-2. (in Russian)
3. Lazareva A.V., Chebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar V.I., Mayanskiy N.A. Pseudomonas aeruginosa: pathogenicity, pathogenesis and pathology. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2015; 17(3): 170-86. (in Russian)
4. Voronina O.L., Kunda M.S., Avetisyan L.R. et al. Characteristic features of Pseudomonas *aeruginosa* strains, causing hospital infections in patients of surgical departments of Shumakov FNTsTIO. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2012; 14(2): 889. (in Russian)
5. Pace J.L., Rupp M.E., Roger G.F., eds. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. Taylor & Francis Group; 2006.
6. Mah T.F., Pitts B., Pellock B., Walker G.C., Stewart P.S., O'Toole G.A. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 2003; 426(5): 306-10.
7. Rybtke M., Hultqvist L.D., Givskov M., Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. *J. Mol. Biol*. 2015; 427(23): 3628-45.
8. Ilyukevich G.V. *Pseudomonas aeruginosa* infection: into a new century with an old problem. *Meditsinskie Novosti*. 2004; (12): 3-8. (in Russian)
9. Osipova E.V., Shipitsyna I.V. Studying adhesive characteristics of *Escherichia coli* uropathogenic strains in patients with spinal-cerebrospinal injury. *Urologiya.* 2014; (2): 20-4. (in Russian)
10. Stepanović S., Vuković D., Jezek P., Pavlović M., Svabic-Vlahović M. Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001; 20 (7): 502-4.
11. Gaydyshev I.P. The solution of scientific and engineering problems by means of Excel, VBA and C/C++. St.Petersburg: BKhV-Petersburg; 2004. (in Russian)
12. Shimada T., Matsumura I. Immune evasion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2014; 37 (1): 33-41.
13. Watters C., DeLeon K., Trivedi U., Griswold J.A., Lyte M., Hampel K.J., Wargo M.J., Rumbaugh K.P. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms perturb wound resolution and antibiotic tolerance in diabetic mice. *Med. Microbiol. Immunol*. 2013; 202 (2): 131-41.
14. Melezhik I.A., Yavorskaya N.V, Shepelevich V.V., Kokozey V.N. The role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the development of endogenous infections. *Byulleten´ Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN (elektronnyi zhurnal).* 2013; 3. (in Russian)
15. Osipova E.V., Shipitsyna I.V. Informational characteristics of microbial biofilms formed by clinical strains of Klebsiella *pneumoniae in vitro* on the surface of the cover glass. *Geniy ortopedii.* 2019; 24(4): 478-81. (in Russian)
16. Rojo-Molinero E., Macià M.D., Rubio R., Moyà B., Cabot G., López-Causapé C., Pérez J.L., Cantón R., Oliver A. Sequential treatment of biofilms with Aztreonam and Tobramycin is a novel strategy for combating Pseudomonas aeruginosa chronic respiratory infections. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2016; 60 (5): 2912-22.

Поступила 29.10.19
Принята к печати 06.11.19

RUSSIAN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS. 2020; 65(1)
DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-42-49

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Червинец В. М.[1], Миронов А. Ю.[2], Червинец Ю. В.[1], Базлов С.Н.[1]

СОСТОЯНИЕ И ЗНАЧЕНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗОВ ПИЩЕВОДА, ЖЕЛУДКА, ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ ПРИ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ, ХРОНИЧЕСКОМ ГАСТРИТЕ, ЭЗОФАГИТЕ

[1]ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава РФ, 170100, Тверь, Россия;
[2]ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

Исследована микрофлора 64 биоптатов, взятых при фиброгастродуоденоскопии слизистой оболочки (СО) пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки (ДПК) у здоровых добровольцев и 1120 образцов, полученных из этих же отделов пищеварительного тракта у больных с эзофагитом, хроническим гастритом, язвенной болезнью. Возраст пациентов от 18 до 62 лет. Микроорганизмы выделяли и идентифицировали культуральным методом. Из биоптатов здоровых респондентов высеяны Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Lactobacillus spp., Bacteroides spp., Stomatococcus spp., Corynebacterium spp., Micrococcus spp., Neisseria spp., Veilonella spp., Enterobacteriaceae в количестве от 3,2 до 4,68 lg КОЕ/г. H. pylori выделялся в пищеводе в 60% (5,66 lg КОЕ/г), из фундального отдела желудка в 33,3% случаев (5,12 lg КОЕ/г), из антрального отдела – в 44,4% (5,25 lg КОЕ/г), из СО ДПК – в 5,5% (4,2 lg КОЕ/г). В образцах, полученных из воспалённой и эрозированной СО пищевода, желудка, ДПК выявлялись условно-патогенные микроорганизмы (УПМ) родов Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Pseudomonas, Peptococcus, Actinomyces, грибы рода Candida и др. в количестве, превышающим 4 lg КОЕ/г. H. pylori изолирован у 6,3-16,7% больных (4,25-4,6 lg КОЕ/г), не доминировал по отношению к другим микроорганизмам, в большинстве случаев имел низкую частоту встречаемости. При рецидиве язвенной болезни, обострении хронического гастрита и эзофагита развивается дисбиоз, характеризующийся увеличением видового и количественного состава УПМ, усилением их ферментативной и цитотоксической активности, что может способствовать поддержанию воспалительно-некротических процессов и тормозить ликвидацию патологического процесса.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori; дисбактериоз; мукозная микрофлора; эзофагогастродуоденальная зона.*

Для цитирования: *Червинец В. М., Миронов А. Ю., Червинец Ю. В., Базлов С.Н. Состояние и значение микробиоценозов пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки при язвенной болезни, хроническом гастрите, эзофагите. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1): 42-49*

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-42-49

Chervinets V.M.[1], Mironov A.Yu.[2] ·Chervinets Yu.V.[1], Bazlov S.N.[1]

THE STATE AND ROLE OF ESOPHAGUS, STOMACH, INTESTINAL MICROBIOTA IN PATIENTS WITH ULCER DISEASE, CHRONIC GASTRITIS, ESOPHAGITIS

[1]Tver State Medical University, 170100,Tver, Russia;
[2]G.N. Gabrichevskogo Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 125212,Moscow, Russia

The microflora of 64 biopsies taken during fibrogastroduodenoscopy of the mucous membrane of the esophagus, stomach and duodenum in healthy volunteers and 1120 samples obtained from the same parts of the digestive tract in patients with esophagitis, chronic gastritis and peptic ulcer disease were studied. The patients ranged in age from 18 to 62 years. Traditional bacteriological method was used to isolate and identify microorganisms. Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Lactobacillus spp., Bacteroides spp., Stomatococcus spp., Enterobacteriaceae, Corynebacterium spp., Micrococcus spp., Neisseria spp., Veilonella spp. were isolated from biopsies of healthy respondents in an average amount from 3.2 to 4.68 lg CFU/g. H.pylori was found in 60% (5.66 lg CFU/g) in the esophagus, in 33.3% of cases (5.12 lg CFU/g) from the fundal part of the stomach, in 44.4% (5.25 lg CFU/g) from the antral part of the stomach, in 5.5% (4.2 lg CFU/g) in the duodenal mucosa. In samples obtained from the inflamed and eroded mucous membrane of the esophagus, stomach and duodenum, opportunistic bacteria of the genera Klebsiella, Enterobacter, Proteus, Pseudomonas, Peptococcus, Actinomyces, yeast fungi of the genus Candida etc. were detected in an amount exceeding 4 lg CFU/g. H. pylori isolated in 6.3-16.7% of patients (4.25-4.6 lg CFU/g) and did not dominate in relation to other microorganisms, and in most cases had a low frequency of its occurrence. In patients with the recurrence of peptic ulcer disease, exacerbation of chronic gastritis and esophagitis, dysbiosis was developed, characterized by an increase in the species and quantitative composition of opportunistic microflora, an increase in its enzymatic and cytotoxic activity, which can contribute to the maintenance of inflammatory and necrotic processes and inhibit the elimination of the pathological process.

Keywords: *Helicobacter pylori; dysbacteriosis; mucosal microflora; esophagogastroduodenal zone.*

For citation: *Chervinets V. M., Mironov A. Yu., Chervinets Yu. V., Bazlov S.N. The state and role of esophagus, stomach, intestinal microbiota in patients with ulcer disease, chronic gastritis, esophagitis. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2019; 65 (1): 42-49 (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-42-49*

For correspondence: *Chervinets V. M.,* Doctor of Medical Sciences, professor, head of the department of microbiology and virusology with course of immunology; e-mail: chervinets@mail.ru

Для корреспонденции: *Червинец Вячеслав Михайлович*, д-р мед.наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии; e-mail: chervinets@mail.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-42-49

Information about authors:

Chervinets V. M., https://orcid.org/0000-0001-6549-0010
Mironov A. Yu., https://orcid.org/0000-0003-4148-0752
Chervinets Yu. V., https://orcid.org/0000-0001-9209-7839

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

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 09.12.2019
Accepted 24.12.2019

Введение. Большинство исследователей рассматривают *Helicobacter pylori* (Hp) в качестве этиологического фактора хронического гастрита (ХГ), язвенной болезни желудка (ЯБЖ) и 12-перстной кишки (ЯБДПК) [1-7]. Об этом свидетельствует снижение случаев рецидивов язв на 5-10% при проведении антихеликобактериальной терапии [8]. У жителей России Hp обнаруживают у 65-92% здоровых лиц в зависимости от региона [9]. Hp встречается у больных с различной локализацией язвы, реже при язве ДПК. У больных данной патологией встречаются в большом разнообразии и другие микроорганизмы: Prevotella, Neisseria, Streptococcus, *Pseudomonas,* подтверждено преобладание их и при ХГ [10, 11, 12]. Патогенность Hp реализуется не всегда, заболевания ЖКТ развиваются при сочетании генетических, аутоиммунных и др. факторов [13]. Рано утверждать о приобретении Hp статуса УПМ, но при колонизации биотопов желудка Hp приобрёл белки Hpn и Hpn-2, позволяющие приспособиться к агрессивной среде желудка, что, возможно, свидетельствует о перераспределении симбиотических отношений с организмом [14]. Hp повышает местный противовоспалительный иммунитет за счёт нейтрофильной инфильтрации слизистой оболочки (СО) желудка [15]. Патогенность Hp реализуется за счёт регуляции экспрессии генов патогенности, в той степени, в какой это диктуется реакцией организма. Патогенное действие Hp на СО желудка и ДПК возможно только у определённой части популяции, характеризующейся недостаточностью защитных механизмов, в первую очередь иммунных [16].

Мукозная микрофлора эзофагогастродуоденальной зоны и её роль при эзофагите, ХГ, ЯБЖ, ЯБДПК изучена недостаточно. Не выяснены взаимоотношения Hp с микроорганизмами гастродуоденальной зоны, роль микробных ассоциаций в патогенезе воспалительно-язвенных поражений СО пищевода, желудка, ДПК. Микрофлора интактной СО пищевода, желудка, ДПК мало изучена в видовом и количественном отношении. Немногочисленны и противоречивы данные о причастности Hp и другой мукозной микрофлоры к рецидивам воспалительно-эрозивно-язвенных поражений пищевода. Отсутствуют данные о признаках, ассоциируемых с вирулентностью УПМ, вегетирующих в очаге воспаления. Мало разработан вопрос об антимикробной терапии воспалительно-язвенных заболеваний пищевода и гастродуоденальной зоны, коррекции микроэкологических нарушений и восстановления иммунного статуса.

Цель исследования – изучить микробный пейзаж СО верхнего отдела ЖКТ у здоровых лиц и пациентов с воспалительно-эрозивно-язвенными поражениями пищевода, желудка, ДПК; определить характер нарушения микробиоценозов и значение выявленных сдвигов в патогенезе данных патологических состояний.

Материал и методы. Исследовано 64 биоптата СО пищевода, желудка, ДПК от 28 здоровых добровольцев и 1120 биоптатов, полученных из этих же отделов ЖКТ от 16 больных, страдающих эзофагитом, 24 – ХГ, 203 – язвенной болезнью, лечившихся в ЛПУ г. Твери. Возраст пациентов от 18 до 62 лет.

Из аналита выделены клинические штаммы: *Staphylococcus spp*. – 55, *Streptococcus spp*. – 31, *H. pylori* – 54, *Peptococcus spp.* -17, *Peptostreptococcus spp.* – 20, *Criptococcus spp*. – 15, *Gemella spp.* – 8, *Enterococcus spp.* – 10, *Prevotella spp.* – 5, *Corynebacterium spp. – 15, Bifidobacterium spp. – 2, Bacillus spp. – 17, Lactobacillus spp. – 23, Micrococcus spp. – 28, Aerococcus viridans – 16, Pseudomonas spp. – 81, Enterobacter spp. – 13, Acinetobacter spp. – 20, Aeromonas spp. – 10, Serratia spp. – 5, Hafnia alvei – 5, Alcaligenes spp. – 10, Citrobacter spp. – 12, Yersinia spp. – 5, Eubacterium spp. – 5, Veillonella spp. – 7, E. coli – 13, Actinomyces spp – 15, Candida spp. – 50, Trichosporon spp.* – 10.

Микробная обсеменённость СО гастродуоденальной зоны определялась в биоптатах, взятых при фиброгастродуоденоскопии из периульцерозной зоны (ПУЗ), антрального и фундального отдела желудка больных ХГ, ЯБЖ, ЯБДК, из СО нижней трети пищевода больных эзофагитами. Биопсийный материал брали у вновь поступивших больных до начала лечения из ПУЗ, из визуально неизменённого участка ДПК, из антрального и фундального отдела желудка. Выделение и идентификация чистых культур проводилась по общепринятым схемам.

Цитотоксичность микроорганизмов определялась по состоянию монослоя в виде изменения морфологии деструкции, отслоения клеток по модифицированной нами методике. Антагонистическая активность микроорганизмов выявлялась методом агаровых слоёв. При работе с требовательными к факторам роста микроорганизмами использован метод «агаровых блоков» [17].

Антилизоцимная активность (АЛА) микроорганизмов определялась по методу отсроченного антагонизма [18]. Лецитиназную, гемолитическую, каталазную, желатиназную, ДНК-ую, РНК-ую, казеинолитическую активности изучали ускоренным методом [19]. Оксидазный тест проводили со стандартными индикаторными дисками Oxidase test (bioMérieux). Продукцию уреазы определяли используя стандартный Urease Test Broth (BBL^{å}, USA). Степень адгезии микроорганизмов определяли, пользуясь средним показателем адгезии (СПА) по методу В.И. Брилис (1986) на эритроцитах человека О (I) группы Rh^{+} и на культуре клеток Hep 2 [20]. Данные экспериментов обрабатывались прикладной программой «STATISTICA» (StatSoftRussia) с использованием критерия Фишера, различия считали достоверными при $p<0,05$.

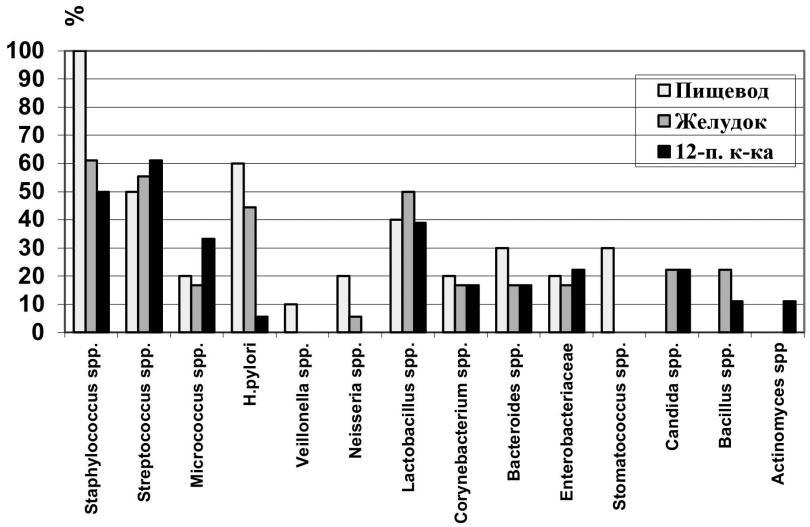


Рис. 1. Спектр и частота встречаемости микроорганизмов СО пищевода, желудка, ДПК здоровых людей, $p<0,05$.

Здесь и на рис. 2-6: по оси абсцисс – наименования микроорганизмов; по оси ординат – распространенность микроорганизмов (%). Столбцы слева направо: первый – пищевод, второй-желудок, третий – двенадцатиперстная кишка.

Результаты. Исследованиями, проведёнными у 28 практически здоровых добровольцев, установлено, что микрофлора эндоскопически интактной СО эзофагогастро-дуоденальной зоны немногочисленна в видовом и количественном отношении. У 96,4% лиц из биоптатов СО пищевода, фундального, антрального отделов желудка, луковицы ДПК выделены микроорганизмы, включающие представителей 11 родов и порядка *Enterobacteriales* (рис. 1).

Из СО пищевода часто выделяли *Staphylococcus spp*. (в 100% случаев), Нр (в 60%), *Streptococcus spp*. (в 50%), *Lactobacillus spp.* (в 40%), реже, в 10-30% – *Bacteroides spp.*, *Stomatococcus spp.*, энтеробактерии, *Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.*, *Neisseria spp.*, *Veillonella spp.* в среднем количестве от 3,2 до 4,68 lg КОЕ/г., что частично совпадает с данными [21], в отношении доминирования стрептококков, но вторыми и третьими по встречаемости были *Prevotella spp.* и *Veillonella spp.*

Из СО желудка и ДПК высевали *Staphylococcus spp.* (61,1% случаев), *Streptococcus spp.* (44-55,5%), *Lactobacillus spp.* (44-50%), Нр (44-5,5%), *Corynebacterium spp., Bacillus spp., Micrococcus spp.,* порядка *Enterobacteriales*, грибы рода *Candida* (22,2-27,7%), у 5,5-16,7% обследованных – *Bacteroides spp., Actinomyces spp., Neisseria spp.*. Количество микроорганизмов не превышало 4 lg КОЕ/г, и колебалось в пределах 2,77-3,87 lg КОЕ/г.

Нр выделяли в антральном и фундальном отделе желудка, ДПК, пищеводе соответственно в 44,4%, 33,3%, 5,5% и 60%. Количество Нр составляло 5,12-5,66 lg КОЕ/г в пищеводе, желудке, ДПК. В монокультуре Нр не обнаружен.

Из биоптатов СО ПУЗ больных ЯБЖ (рис. 2) высеяны бактерии 15 родов: *Staphylococcus spp*. у 79,2% больных в среднем количестве 4,9 lg КОЕ/г, *Streptococcus spp*. у 58,3% (5,43 lg КОЕ/г), *Corynebacterium spp.* у 37,5% (3,66 lg КОЕ/г), *Candida spp.* у 33,3% (4,6 lg КОЕ/г), *Bacteroides spp.* у 42,86% (4,77 lg КОЕ/г). У 35,7% больных выделялись *S. aureus* (3,15 lg КОЕ/г), у 29,2% – *Lactobacillus spp.* (4,76 lg КОЕ/г), у 33,3% – *Micrococcus spp.* (2,8 lg КОЕ/г), у 20,8% – бактерии порядка *Enterobacteriales* (4,5 lg КОЕ/г), *Veillonella spp*. (3,54 lg КОЕ/г). Нр выявлен у 16,7% больных (4,25 lg КОЕ/г). *Actinomyces spp*. (3,06 lg КОЕ/г) – у 12,5%. В 4,2% случаев выделены *Neisseria spp.* (4,06 lg КОЕ/г), *Enterobacter spp.* (4,16 lg КОЕ/г), *Bacillus spp.* (3,44 lg КОЕ/г).

В СО ПУЗ больных ЯБЖ появляются *Veillonella spp., Actinomyces spp., Peptococcus spp., Enterobacter spp., Pseudomonas spp*. Большинство выделенных микроорганизмов проявляли патогенный потенциал (гемолизин, лецитиназа, РНК-аза, протеаза, уреаза и др.), включая цитотоксические свойства.

Из биоптатов СО ПУЗ при рецидиве ЯБДПК выделены представители 28 родов микроорганизмов (рис. 2). В 100-40,6% случаев выделены *Staphylococcus spp., Streptococcus spp.,* энтеробактерии, *Bacteroides spp*., *Lactobacillus spp.*, *Micrococcus spp*., грибы рода *Candida*. В 23,6-12,3% случаев, высевались *Corynebacterium spp., Veillonella spp., Actinomyces spp., Peptococcus spp., Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp*. Менее чем в 8% обнаруживались *Peptostreptococcus spp., Neisseria spp*., *Prevotella spp., Citrobacter spp., Acinetobacter spp.* и др. Нр выделялись у 33% больных в количестве 4,74 lg КОЕ/г. Количественно доминировали (4,42-5,4 lg КОЕ/г) Нр, бактерии родов *Streptococcus, Peptostreptococcus, Bacteroides, Prevotella, Staphylococcus, Lactobacillus*, бактерии порядка *Enterobacteriales*. В меньшем количестве (3,15-4,4 lg КОЕ/г) выявлялись грибы рода *Candida,* бактерии родов *Veillonella, Peptococcus, Corynebacterium, Neisseria, Pseudomonas, Porphyromonas, Actinomyces* и др.

Активация мукозной микрофлоры отмечена не только в ПУЗ, но и в отдалённых от неё участках СО. В отдалении от язвы из видимо неизменённого участка СО микроорганизмы выявлялись существенно чаще, чем у здоровых, хотя в меньшем видовом и количественном составе, чем из ПУЗ (рис. 3). *Staphylococcus spp.* выделены от 41,7% обследованных в количестве 4,8 lg КОЕ/г, *Streptococcus spp.* и *Corynebacterium spp.* – 20,8% (5,7 и 4,18 lg КОЕ/г соответственно), *Bacteroides spp., Enterobacteriales, Candida spp* – 12,5% (5,4, 4,77 и 2,76 lg КОЕ/г), *Lactobacillus spp., Micrococcus spp* – 8,3% (4,24

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-42-49

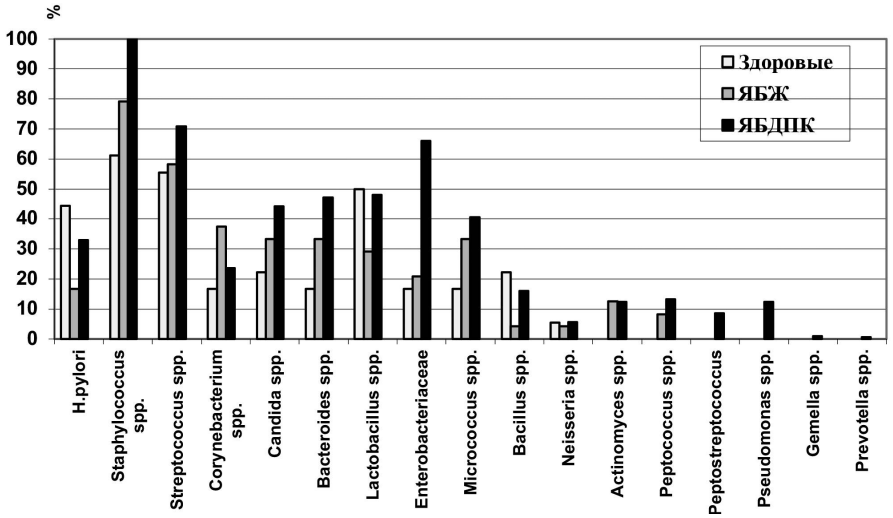


Рис. 2 Частота выделения из биоптатов ПУЗ СО желудка и ДПК здоровых и больных ЯБ, $p<0,05$.
Столбцы слева направо: первый – здоровые, второй – больные с ЯБЖ, третий – больные с ЯБДПК.

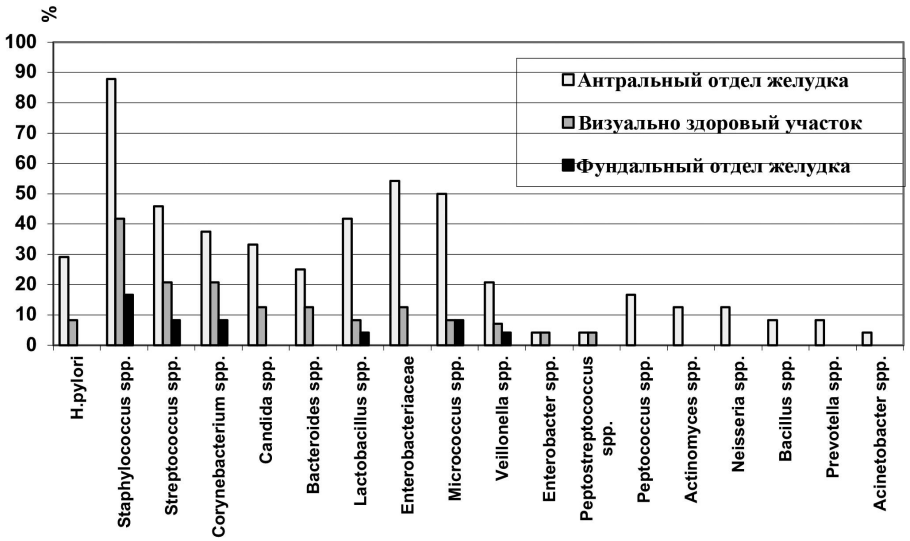


Рис. 3 Спектр и частота выделения микроорганизмов из отдалённого от язвы участка СО больных ЯБЖ, $p<0,05$.
Столбцы слева направо: первый – антральный отдел желудка, второй – визуально здоровый участок, третий – фундальный отдел желудка.

и 4,2 lg КОЕ/г), *Veillonella spp.* – 7,14% (2,77 lg КОЕ/г), *Enterobacter spp.* и *Peptostreptococcus spp.* – 4,2% (3,06 и 4,94 lg КОЕ/г). Нр выделен от небольшого числа больных – 8,3%, но в больших количествах – 5,47 lg КОЕ/г. Из фундального отдела желудка микрофлора выделена в 4,2-16,7% случаев в ассоциации 2-3 культур в количестве от 2,76 до 3,39 lg КОЕ/г. Нр в фундальном отделе не обнаружен. Микробный пейзаж антрального отдела желудка сходен с микробиоценозом области язвы. Нр выделен от 29,2% больных в количестве 5,23 lg КОЕ/г, т. е. на 12,5% чаще, чем из ПУЗ.

Из визуально неизменённого участка СО в отдалении от ПУЗ ДПК микроорганизмы выделены в виде микробного дисбаланса: в меньшем спектре и процентном соотношении (рис. 4). В 20,8-50,9% выявлены *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, энтеробактерии, *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides spp.*, грибы рода *Candida*. Нр выделен в 14,2% случаев в количестве 4,7 lg КОЕ/г. Представители других 12 родов изолированы от 0,9-15,1% обследованных больных. В количестве более 4 lg КОЕ/г выявлены *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Peptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Veillonella spp.*, *Prevotella spp.*, грибы рода *Candida*.

Микробный пейзаж изменяется при язвенном поражении ДПК и в СО желудка. В антральном отделе желудка больных ЯБДПК на 10-20% больше, чем у здоровых, выделяются *Enterobacteriales*, *Bacteroides spp., Micrococcus spp.*, грибы рода *Candida.* В количественном отношении превышают 4 lg КОЕ/г бактерии родов *Streptococcus, Staphylococcus, Bacteroides, Veillonella, Corynebacterium, Peptococcus,* порядка *Enterobacteriales,* грибов рода *Candida.* Появляются в количестве более 4 lg КОЕ/г бактерии рода *Pseudomonas, Proteus, Porphyromonas.* На 10% меньше выделено Нр (34,37%), хотя и в больших количествах (5,18 lg КОЕ/г). Большинство микроорганизмов выделено в ассоциации от 3 до 6 культур, что больше, чем у здоровых людей.

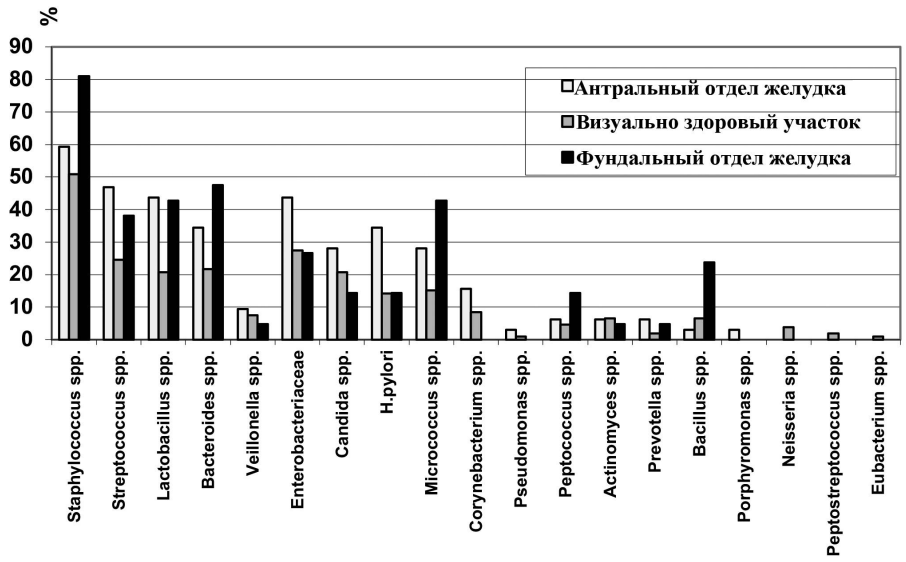


Рис. 4. Спектр и частота выделения микроорганизмов из антрального и фундального отделов желудка, отдалённых от язвы участков СО больных ЯБДПК, $p<0,05$.

Столбцы слева направо: первый – антральный отдел желудка, второй – визуально здоровый участок, третий – фундальный отдел желудка.

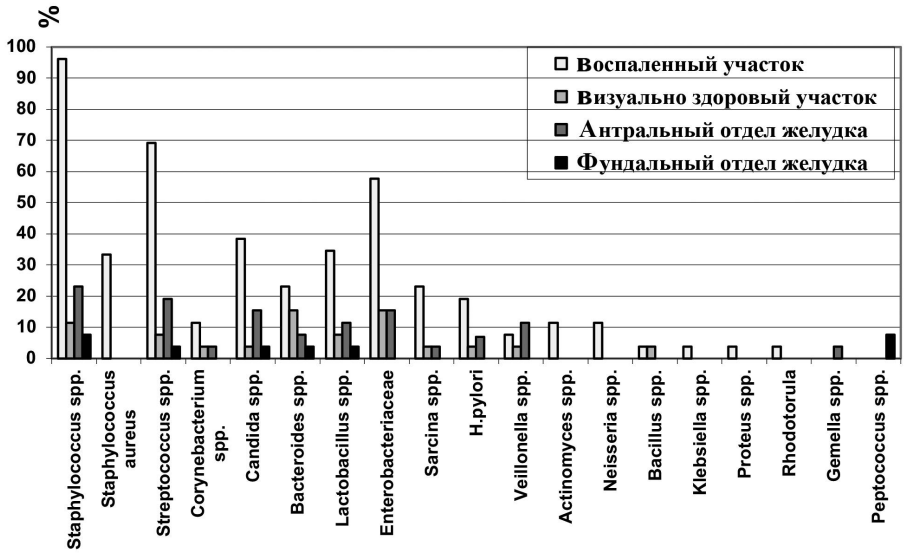


Рис. 5. Спектр и частота выделения микроорганизмов из СО желудка больных ХГ, $p<0,05$.

Столбцы слева направо: первый – воспаленный участок, второй – визуально здоровый участок, третий – антральный отдел желудка, четвертый – фундальный отдел желудка.

В СО фундального отдела желудка больных ЯБДПК (рис. 4), по сравнению со здоровой СО, появляется *S. aureus* (33,3% выделений), *Peptococcus spp.* (14,3%), *Micrococcus spp.* (42,8%), *Gemella spp.* (9,5%), *Prevotella spp.* (4,76%), *Actinomyces spp*. (4,76%), *Veillonella spp.* (4,76%). На 21% увеличивается выделение других видов стафилококка, на 31% – бактероидов. От меньшего числа обследованных больных (14,3%) выделяется Нр и в меньшем количестве (4,04 lg КОЕ/г). В количестве больше 4 lg КОЕ/г выделены *Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Bacteroides spp.*, *Prevotella spp*., *Lactobacillus spp.*

Из биоптатов воспаленной СО больных ХГ чаще выявлялись *Staphylococcus spp*., *Streptococcus spp*., бактерии порядка *Enterobacteriales*, соответственно в 96,2%, 69,2, 57,7% случаев (рис. 5). В 38,5% грибы рода *Candida,* в 34,6% *Lactobacillus spp.*, в 23,1% *Micrococcus spp., Bacteroides spp*., в 11,5% *Corynebacterium spp.*, *Actinomyces spp*, *Neisseria spp*., в 7,7% *Veillonella spp.*, в 3,8% *Bacillus spp.*, *Klebsiella spp*., *Proteus spp*., *Rhodotorula spp*. Выделены микроорганизмы 17 родов и видов в количестве от 2,58 lg КОЕ/г до 4,63 lg КОЕ/г, в среднем 3,38±0,54 lg КОЕ/г. В количестве более 4 lg КОЕ/г выделены *Streptococcus spp*., *Bacteroides spp*., энтеробактерии, *Veillonella spp.*, *Neisseria spp*., *Lactobacillus spp.* Нр выделен в 19,2% случаев в количестве 4,6 lg КОЕ/г.

Из визуально неизменённого участка СО рядом с зоной гиперемии во всех случаях высевались представители тех же родов бактерий, количество которых в среднем составляло 3,64±0,53 lg КОЕ/г, но в меньшем проценте

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-42-49

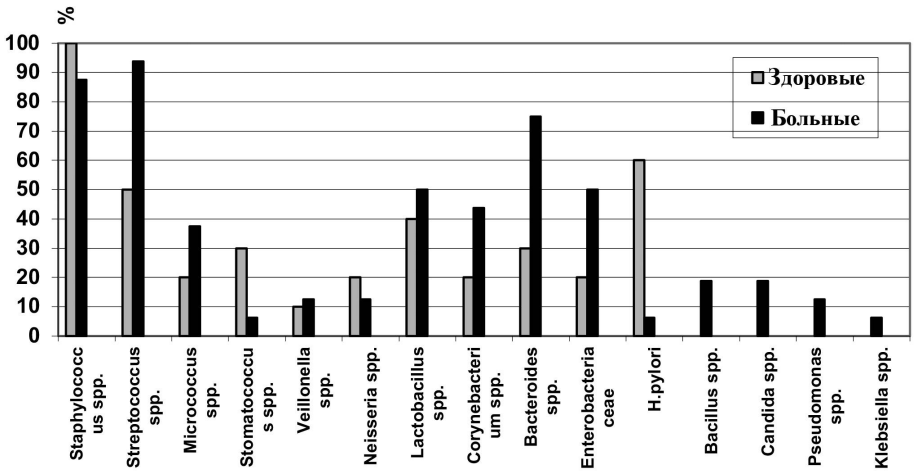


Рис. 6. Спектр и частота выделения микроорганизмов из СО пищевода здоровых лиц и больных эзофагитом, $p<0,05$.
Столбцы слева направо: первый – здоровые люди, второй – больные эзофагитом.

случаев. Нр из видимо неизменённого участка СО выделен в 3,8% в количестве 4,22 lg КОЕ/г.

При исследовании биоптатов СО антрального отдела желудка у больных ХГ чаще выделены бактерии рода *Staphylococcus* (в 23,1% случаев). У 19,2% больных выявлены стрептококки, от 15,4% – бактерии прядка *Enterobacteriales,* грибы рода *Candida,* от 11,5% – бактерии рода *Veillonella, Lactobacillus,* от 7,7% – *Bacteroides*, от 3,8% – *Corynebacterium, Gemella, Micrococcus*. Количество микроорганизмов колебалось от 2,77 lg КОЕ/г до 4,34 lg КОЕ/г, в среднем 3,6±0,54 lg КОЕ/г. Нр выделен у 7% обследованных в количестве 4,34 lg КОЕ/г.

В фундальном отделе желудка при ХГ спектр микрофлоры небольшой. Количество микроорганизмов колебалась от 2,92 lg КОЕ/г (*Candida spp.*) до 4,34 lg КОЕ/г (*Peptococcus spp*.), в среднем 3,778±0,51 lg КОЕ/г. В количестве более 4 lg КОЕ/г выделены *Streptococcus spp*., *Peptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* Нр ни в одном случае не выявлен.

В зоне атрофии СО желудка при ХГ в 100% обнаружены *Streptococcus spp*., в 83,3% – *Staphylococcus spp*., *Bacteroides spp*., энтеробактерии, в 50% – грибы рода *Candida,* в 3,3% – *Veillonella spp.*, *Lactobacillus spp.*, *S. aureus*, в 8,3% –*Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*. Количество микроорганизмов колебалось от 2,7 lg КОЕ/г (коринебактерии) до 5,3 lg КОЕ/г (энтеробактерии), в среднем 3,82±0,77 lg КОЕ/г. Нр выделен у 33,3% больных в количестве 4,2 lg КОЕ/г. При ХГ выделены: Нр 41,7% *Proteobacteria* (69,3%), *Firmicutes* (14,7%), *Bacteroides spp.* (9,0%), *Actinobacteria spp.* (4,3%), *Fusobacteria spp.* (1,3%).

Из биоптатов СО пищевода больных эзофагитом из зоны воспалительно изменённой СО выделены микроорганизмы 15 родов, что на 4 рода больше, чем у здоровых лиц (рис. 6). Часто (у 93,75-50% больных) выделялись бактерии рода *Streptococcus, Staphylococcus, Bacteroides, Lactobacillus,* порядка *Enterobacteriales*. Реже, в 43,75-12,5% случаев обнаружены бактерии рода *Corynebacterium, Micrococcus, Bacillus, Veillonella, Neisseria, Pseudomonas,* грибы рода *Candida*. У 6,25% больных выделены *Stomatococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, Нр. Частота выделения *Stomatococcus spp*., *Staphylococcus spp*., *Neisseria spp*. на 23,75-7,5% ниже, чем у здоровых людей ($p>0.05$). Повышение частоты выделения на 17,5-45% отмечено у *Streptococcus spp*., *Bacterodes spp*., энтеробактерий, *Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.* ($p<0,05$). Появились бактерии родов *Bacillus, Pseudomonas, Klebsiella,* грибы рода *Candida*. Количество микроорганизмов в пределах от 3,16 lg КОЕ/г (*Corynebacterium spp.*) до 6,2 lg КОЕ/г (*Stomatococcus spp*.), в среднем 4,55±0,767 lg КОЕ/г, что больше, чем у здоровых людей на 0,6±0,88 ($p=0,048$). Выделение Нр снизилась с 60% до 6,25% ($p<0.05$) по сравнению с группой здоровых, количество с 5,66 lg КОЕ/г до 4,5 lg КОЕ/г. В монокультуре Нр не выявлен.

В зоне воспалительно-язвенных поражений пищевода, в ПУЗ у больных ЯБЖ и ЯБДК выявлен дисбиоз, выражающийся в увеличении спектра и количества микрофлоры, появлении нетипичных для данного биотопа бактерий. Микробиоценоз включал до 28 родов микроорганизмов с уменьшением выделения Нр. По частоте встречаемости и количеству преобладают *Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Bacteroides spp., Lactobacillus spp., Corynebacterium spp., Enterobacteriaceae,* грибы рода *Candida*. В очаге поражения появляются микроорганизмы в количестве больше 4 lg КОЕ/г, что указывает на причастность их к неблагоприятному развитию заболевания.

Изучение ферментативных свойств клинических изолятов из поражённых участков СО эзофаго-гастродуоденальной зоны показало, что они имеют высокие показатели признаков, коррелирующих с патогенностью. По сравнению с бактериями, выделенными со СО здоровых людей, в большем числе случаев обнаруживаются гемолитические стафилококки, стрептококки. Гемолитической активностью обладали штаммы бактерий родов: *Neisseria, Bacillus, Veillonella, Peptococcus, Pseudomonas, E. coli.* Выделяются бактерии с лецитиназной активностью: стафилококки, стрептококки, бациллы, коринебактерии, псевдомонады, энтеробактерии. Выявляются штаммы с РНК-азной активностью: псевдомонады, стафилококки, стрептококки и даже лактобациллы. Казеинолитическая активность отмечена у псевдомонад, стрептококков, бактероидов. Уреаза, кроме Нр, продуцируется пептококками, микрококками стрептококками, стафилококками, криптококками, псевдомонадами, грибами рода *Candida.*

Цитотоксическими свойствами обладало большинство выделенных микроорганизмов со СО больных: Нр, стафилококки, стрептококки, пептококки, микрококки, лактобактерии, актиномицеты, псевдомонады, энтеробактерии (цитробактеры, серрации, ацинетобактеры, *E. coli*), грибы рода *Candida*. Определение цитотоксического действия бактерий на клетки НЕр-2 подтверждает, что УПМ могут быть причастны к развитию патологического процесса в зоне воспалительно-язвенного поражения СО пищевода, желудка, ДПК [22].

Грамположительные кокки, выделенные из СО пищевода, желудка, ДПК у больных эзофагитом, ХГ и ЯБ в 85,7-94,7% случаев не обладают АЛА. У *Corynebacterium* spp. отсутствие АЛА отмечено в 62,5% случаев. В 14,3-33,3% случаев выделены стафилококки и стрептококки, продуцирующие лизоцим, что позволяет отнести этот признак к факторам, определяющим селективные преимущества бактерий при выживании в микробиоценозе. Продукция *E. coli* и *Lactobacillus spp.* бактериоцинов и микроцинов важна для выживания в микробиоценозе. *L. johnsonii, L. murinus, L. reuteri* могут негативно воздействовать на Нр посредством выделения ингибирущих рост веществ [23].

Адгезивные свойства выявлены практически у всех исследуемых бактерий. В большей степени средний показатель адгезии (СПА) 3-5 бактерий на клетке обнаружены у бактерий рода *Serratia, Alcaligenes, Escherichia, Acinetobacter, Pseudomonas, Staphylococcus.* У Нр СПА в среднем составил 1,5.

Обсуждение. Микробиоценоз зоны воспалительно-язвенных поражений пищевода, желудка, ДПК при эзофагите, ХГ, ЯБ позволяет утверждать, что речь идёт о дисбиозе, выражающемся в увеличении видового и количественного состава микрофлоры, появлении нетипичных для данного биотопа бактерий с признаками патогенности (гемолитической, лецитиназной, РНК-азной, казеинолитической, каталазной, уреазной, цитотоксической активностью). Доминирующая микрофлора больных в поражённой СО кроме Нр, представлена агрессивными штаммами стрептококков, стафилококков, пептококков, псевдомонад, лактобактерий, бацилл, коринебактерий и других УПМ, которые могут быть причастными к утяжелению патологического процесса. В поражённой СО среди нормальных обитателей ЖКТ происходит селекция штаммов бактерий с патогенным потенциалом и их усиленное размножение.

Дисбиоз может вести не только к увеличению возможности заражения патогенными микробами, но и УПМ транзиторной НМФ. Дисбиоз характеризуется исчезновением или снижением популяционного уровня ряда облигатных представителей НМФ (бифидобактерий, лактобацилл, бактероидов и др.), увеличением частоты выявления и количества представителей факультативной её части (грамотрицательных бактерий, в частности, изменённых эшерихий, клебсиелл, гемолитических стафилококков и др.), появлением необычных для данного биотопа видов. [24-27].

В этих условиях представители НМФ, обладая определёнными механизмами приживления, способны вызывать заболевание при снижении иммунитета. УПМ могут быть причастны к инфекционному процессу при сниженной естественной резистентности организма хозяина, т. е. при иммунодефиците. Многие УПМ, такие как *Proteus vulgaris, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* и др., рассматриваемые в качестве возбудителей ИСМП, относящиеся к транзиторной нормальной микрофлоре, обладают факторами патогенности.

При обострении ЯБ, ХГ, эзофагита в зоне воспалительно-эрозивно-язвенного процесса имеется микробный дисбаланс, выражающийся в увеличении спектра и количества выделяемых УПМ, с усилением выраженности признаков патогенности. Трудно представить, что Нр в этих условиях выступает лидирующим агентом в ассоциации с патогенными штаммами стрептококков, стафилококков, коринебактерий, энтеробактерий, грибов рода *Candida* и других представителей УПМ данных биотопов. Наши данные указывают на возможность реализации признаков патогенности выявляемых микроорганизмов. При обострении изучаемых заболеваний следует говорить о наличии в СО поражённых органов сформированного паразитоценоза, обусловленного снижением местной и общей резистентности. Это подтверждается данными, показывающими, что нарушения микробного баланса при указанных заболеваниях происходят на фоне изменений иммунного статуса больных.

Для санации поражённого участка необходимо избавиться от микрофлоры с выраженными признаками патогенности, восстановить местный и общий иммунный статус и заселить поражённую зону пробиотическими бактериями-антагонистами УПМ.

Для решения этих задач необходимо знать чувствительность всех УПМ, колонизирующих патологический очаг, к антимикробным препаратам, уметь правильно осуществлять антибиотикотерапию препаратами [28,29], которые проявляют не только бактериостатический эффект, но и способны восстанавливать иммунный статус, обладать сорбционной, противовоспалительной активностью и др. полезными свойствами.

При обострении ЯБ, ХГ, эзофагита в СО пищевода, желудка, ДПК происходит активация УПМ, включая Нр, характеризующаяся увеличением видового и количественного состава, усилением ферментативной и цитотоксической активности, что может способствовать поддержанию воспалительно-некротических процессов и тормозить ликвидацию патологического процесса. Активация мукозной микрофлоры связана с воспалительно-некротическими процессами СО ГДЗ, снижением местных и общих факторов клеточного и гуморального иммунитета. Для восстановления нормального микробиоценоза необходима коррекция с использованием препаратов, обладающих антимикробной активностью, сорбционными и иммуномодулирующими свойствами.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4-7, 11, 12, 14, 16, 25-27, 29 см. REFERENCES)

1. Бондаренко В.М, Базлов С.Н., Червинец В.М., Чернин В.В. Терапия дисбактериоза мукозной микрофлоры гастродуоденальной зоны при её воспалительно-эрозивно-язвенных поражениях. *Терапевтический архив.* 2011; 2: 12-6.
2. Чернин В.В., Червинец В.М., Базлов С.Н. Место *Helicobacter pylori* в нормомикробиоценозе и дисбактериозе мукозной микрофлоры эзофагогастродуоденальной зоны, развитии язвенной болезни, хронического гастрита и эзофагита. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016; 126(2): 79-86.
3. Ардатская М.Д., Бельмер С.В., Добрица В.П., Захаренко С.М., Лазебник Л.Б., Минушкин О.Н. и др. Дисбиоз (дисбактериоз)

кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2015; 5 (117): 13-50.
8. Яриев А.А., Каримов Х.Я., Бабаев А.Т. Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки: история вопроса и современные взгляды на патогенез заболевания (обзор литературы). *Вестник неотложной и восстановительной хирургии.* 2018;3 (2): 207-12.
9. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Лапина Т.Л., Шептулин А.А., Трухманов А.С., Абдулхаков Р.А. и др. Лечение инфекции *Helicobacter pylori*: мейнстрим и новации. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2017; 27(4): 4-21.
10. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Беляева Е.А. Микробиоценоз эзофагогастродуоденальной зоны в отсутствие патологии и при воспалительно-эрозивно-язвенных её поражениях. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016; 126(2):108-9.
13. Асатуров А.В., Варзин С.А., Строев Ю.И., Чурилов Л.П., Утехин В.И. Роль аутоиммунологической реактивности в патогенезе осложнённых форм язвенной болезни у детей и взрослых. *Педиатр.* 2018; 9 (6): 93-100.
15. Колотилова М.Л., Иванов Л.Н. Нейрогенно-генетические факторы этиологии и патогенеза язвенной болезни. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2017; 148 (12):89-97.
17. Баженов Л.Г., Бондаренко В.М., Лыкова Е.А. Огай Д.К. Изучение антагонистического действия лактобацилл на *Helicobacter pylori*. *Журнал микробиологии* 1997; 3: 89-91.
18. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Хуснутдинова Л.М. Межбактериальные взаимодействия *Журнал микробиологии*. 2003; 4: 3-8.
19. Никитин В.М. *Справочник методов биохимической экспресс-индикации микробов* Кишинев; 1986.
20. Брилис В.И. Методика изучения адгезивного процесса. *Лабораторное дело*. 1986; 4: 210-2.
21. Евсютина Ю.В., Ивашкин В.Т. Роль микробиома в развитии болезней пищевода. *Российский журнал гастроэнтерологии,гепатологии,колопроктологии*. 2016; 26(3):11-6.
23. Исаева Г.Ш., Вакатова Л.В., Ефимова Н.Г., Бурханов Р.Р., Валиуллина И.Р. Желудочная микробиота при морфологических изменениях гастродуоденального тракта, ассоциированных с инфекцией *Helicobacter pylori*. *Бактериология*. 2017; 2 (1): 4-9.
24. Самоукина А.М., Михайлова Е.С., Червинец В.М., Миронов А.Ю., Алексеева Ю.А. Микроэкология пищеварительного тракта как показатель состояния здоровья человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 6: 57-60.
28. Ситкин С.И., Вахитов Т.Я., Демьянова Е.В. Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии. *Альманах клинической медицины*. 2018; 46 (5): 396-425.

REFERENCES

1. Bondarenko V.M, Bazlov S.N., Chervinec V.M., Chernin V.V. Therapy of dysbacteriosis of mucous microflora of the gastroduodenal zone with its inflammatory-erosive-ulcerative lesions. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2011; 2:12-6. (in Russian)
2. Chernin V.V., Chervinets V.M., Bazlov S.N. The place of Helicobacter pylori in the microbiocenosis and dysbiosis of the mucous microflora of the esophagogastroduodenal zone, the development of peptic ulcer, chronic gastritis and esophagitis. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastrojenterologiya.* 2016; 126(2): 79-86. (in Russian)
3. Ardatskaja M.D., Bel'mer S.V., Dobrica V.P., Zaharenko S.M., Lazebnik L.B., Minushkin O.N. i dr. Intestinal dysbiosis: current state of the problem, comprehensive diagnosis and therapeutic correction. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2015; 5 (117): 13-50. (in Russian)
4. Marshall B.J. Helicobacter pylori: what does it taste like? Medical journal of Australia. 2014; 201(1): 22.
5. Montano V., Didelot X., Foll M., Linz B., Reinhardt R., Suerbaum S.et al. Worldwide population structure, long-term demography, and local adaptation of *Helicobacter pylori Genetics*. 2015; 200: 947-63.
6. Kienesberger S., Cox L.M., Livanos A., Zhang X. S., Chung J., Perez-Perez G. I. et al. Gastric helicobacter pylori infection affects local and distant microbial populations and host responses. *Cell Reports*. 2016;14(6):1395-407.
7. Gravina A. G., Zagari R. M., De Musis C., Romano L., Loguercio C., Romano M. Helicobacter pylori and extragastric diseases: A review. *World Journal Gastroenterology*. 2018; 24(29): 3204-21.
8. Jariev A.A., Karimov H.Ja., Babaev A.T. Peptic ulcer of the stomach and duodenum: history and current views on the pathogenesis of the disease (literature review). *Vestnik neotlozhnoj i vosstanovitel'noy khirurgii*. 2018; 3 (2): 207-12. (in Russian)
9. Ivashkin V.T., Maev I.V., Lapina T.L., Sheptulin A.A., Truhmanov A.S., Abdulhakov R.A. i dr. Helicobacter pylori infection treatment: mainstream and innovations. *Rosiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2017; 27(4): 4-21. (in Russian)
10. Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Belyaeva E.A. Microbiocenosis of the esophagogastroduodenal zone in the absence of pathology and with inflammatory and erosive-ulcerative lesions of it. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastrojenterologiya*. 2016; 126(2):108-9. (in Russian)
11. Chen X., Xia C., Li Q., Jin L., Zheng L., Wu Z. Comparisons between bacterial communities in mucosa in patients with gastric antrum ulcer and a duodenal ulcer. *Frontiers cellular infection Microbiology*. 2018;8:126.
12. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, Costa J. L, Carneiro F., Machado J. C.et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut*. 2017; 67(2): 226-36.
13. Asaturov A.V., Varzin S.A., Stroev Yu.I., Churilov L.P., Utehin V.I. The role of autoimmunological reactivity in the pathogenesis of complicated forms of peptic ulcer in children and adults. *Pediatr*. 2018; 9 (6): 93-100. (in Russian)
14. Vinella D., Fischer F., Vorontsov E., Gallaud J., Malosse C., Michel V.et al. Evolution of Helicobacter: acquisition by gastric species of two histidine-rich proteins essential for colonization. *PLoS Pathogens*. 2015; 11(12): e1005312.
15. Kolotilova M.L., Ivanov L.N. Neurogenic and genetic factors of the etiology and pathogenesis of peptic ulcer. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastrojenterologiya*. 2017; 148 (12):89-97. (in Russian)
16. Neumeyer V., Vieth M., Gerhard M., Mejías-Luque R. Mutated *Rnf43* Aggravates *Helicobacter Pylori*-Induced Gastric Pathology. *Cancers*. 2019; 11(3): 372.
17. Bazhenov L.G., Bondarenko V.M., Lykova E.A, Ogaj D.K. The study of the antagonistic effect of lactobacilli on Helicobacter pylori *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1997; 3: 88-91. (in Russian)
18. Bukharin O.V., Usvyatsov B.Ya., Husnutdinova L.M. Interbacterial interactions. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2003; 4: 3-8. (in Russian)
19. Handbook of methods for biochemical express indication of microbes [*Spravochnik metodov biohimicheskoj jekspress-indikacii mikrobov]*. Kishinev: Cartya Moldovenienasca; 1986. (in Russian)
20. Brilis V.I. The methodology for studying the adhesive process. *Laboratornoe delo*. 1986; 4: 210-2. (in Russian)
21. Evsyutina Yu.V., Ivashkin V.T. The role of microbiome in the development of diseases of the esophagus. *Rossiyskiy zhurnal gastrojenterologii, gepatologii, koloproktologii.* 2016; 26(3): 11-6. (in Russian)
22. Yung-Yu Hsieh Hung-Yu Pan, Shui-Yi Tung, Chih-Wei Yen. Increased Abundance of Clostridium and Fusobacterium in Gastric Microbiota of Patients with Gastric Cancer in Taiwan. *Scientific reports*. 2018; 8 (1): 158.
23. Isaeva G.Sh., Vakatova L.V., Efimova N.G., Burhanov R.R., Valiullina I.R. Gastric microbiota with morphological changes in the gastroduodenal tract associated with Helicobacter pylori infection. *Bakteriologiya.* 2017; 2 (1): 4-9. (in Russian)
24. Samoukina A.M., Mihajlova E.S., Chervinec V.M., Mironov A.Ju., Alekseeva Ju.A. Digestive tract microecology as an indicator of human health. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 6: 57-60. (in Russian)
25. Toh Michael C, Emma Allen-Vercoe. The human gut microbiota with reference to autism spectrum disorder: considering the whole as more than a sum of its parts. *Microbial ecology in health and disease.* 2015; 26: 26309. doi:10.3402/mehd.v26.26309
26. Thomas W. Buford. (Dis). Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease. *Microbiome;* 2017. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0296-0.
27. Pajau Vangay, Tonya Ward, JeffreyB S. Gerber, Dan Knights. Antibiotics, Pediatric Dysbiosis, and Disease, *Cell Host & Microbe*. 2015; 17 (5): 553-64.
28. Sitkin S.I., Vakhitov T.Ya., Dem'yanova E.V. Microbiome, colon dysbiosis and inflammatory bowel disease: when function is more important than taxonomy. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny.* 2018; 46 (5): 396-425. (in Russian)
29. Tariq Jamal Khan, Mohammed Nihal Hasan, Esam I. Azhar, Muhammad Yasir, Association of gut dysbiosis with intestinal metabolites in response to antibiotic treatment, *Human Microbiome Journal.* 2019; 11: 100054. https://doi.org/10.1016/j.humic.2018.11.004

Поступила 09.12.19
Принята к печати 24.12.19

RUSSIAN CLINICAL LABORATORY DIAGNOSTICS. 2020; 65(1)
DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-50-54

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Козлов А.В., Лямин А.В., Жестков А.В., Гусякова О.А., Попова Е.И., Железнова Е.А.

СТРУКТУРА УСЛОВНО-ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА ЖЕНЩИН ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

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

Структура микрофлоры урогенитального тракта женщины вариабельна и разнообразна, изменение ее качественного и количественного состава может влиять на различные физиологические процессы в организме женщине, в том числе и на течение беременности. В данном исследовании проанализированы результаты посевов 1415 образцов мочи и отделяемого цервикального канала беременных женщин. Видовая идентификация проводилась методом MALDI-ToF масс-спектрометрии при помощи масс-спектрометра Microflex LT (Bruker®). В структуре микрофлоры цервикального канала преобладали грамположительные бактерии (69,5%), среди которых превалировали Staphylococcus spp., Enterococcus spp. и Lactobacillus spp. Среди грамотрицательных бактерий чаще других встречались микроорганизмы порядка Enterobacteriales, преобладающим видом среди которых оказалась E.coli. Также из материала цервикального канала были выделены дрожжеподобные грибы, их количество составило 11% от общего числа посевов. Качественный микробиологический состав мочи был представлен грамположительной флорой (68,7%), грамотрицательной флорой (30,1%) и грибами рода Candida (1,2%). Заметно значительное преобладание коагулазонегативных стафилококков (97,3%) над коагулазоположительными (2,7%) в структуре грамположительных микроорганизмов. Состав грамотрицательной флоры преимущественно представлен бактериями порядка Enterobacteriales (71,4%). В результате исследования были выявлены микроорганизмы, которые могут быть причиной возникновения послеродовых осложнений и развития воспалительных заболеваний новорожденного, что говорит о необходимости проведения регулярного микробиологического исследования для беременных.

Ключевые слова: *беременность; микрофлора; цервикальный канал; мочеполовой тракт; новорожденные;*

Для цитирования: *Козлов А.В., Лямин А.В., Жестков А.В., Гусякова О.А., Попова Е.И., Железнова Е.А. Структура условно-патогенной микрофлоры, выделенной из урогенитального тракта женщин при патологическом течении беременности. Клиническая лабораторная диагностика. 2020;65 (1): 50-54. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-50-54*

Kozlov A.V., Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Gusyakova O.A., Popova E.I., Zheleznova E.A.

THE STRUCTURE OF CONDITIONALLY PATHOGENIC MICROFLORA, ISOLATED FROM THE UROGENITAL TRACT OF WOMEN WITH PATHOLOGICAL COURSE OF PREGNANCY

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

The structure of the microflora of the urogenital tract of a woman is variable and diverse, changing its qualitative and quantitative composition can affect various physiological processes in the body of a woman, including the course of pregnancy. In this study, the results of cultures of 1415 samples of urine and cervical canal discharge of pregnant women were analyzed. Species identification was carried out by MALDI-ToF mass spectrometry using Microflex LT (Bruker) mass spectrometer. Gram-positive bacteria (69.5%) dominated the structure of the cervical canal microflora, among which Staphylococcus spp prevailed., Enterococcus spp. and Lactobacillus spp. Among gram-negative bacteria most often encountered microorganisms of the order Enterobacteriales, the predominant species among which was E. coli. Also, yeast-like fungi were isolated from the material of the cervical canal, their number was 11% of the total number of crops. Qualitative microbiological composition of urine was represented by gram-positive flora (68.7%), gram-negative flora (30.1%) and Candida fungi (1.2%). There is a significant predominance of coagulase-negative staphylococci (97.3%) over coagulase-positive (2.7%) in the structure of gram-positive microorganisms. The composition of gram-negative flora is mainly represented by bacteria of the order Enterobacteriales (71.4%). The study identified microorganisms that can cause postpartum complications and the development of inflammatory diseases of the newborn, which suggests the need for regular microbiological examination for pregnant women.

Key words: *pregnancy; microflora; cervical canal; genitourinary tract; newborn;*

For citation: *Kozlov A.V., Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Gusyakova O.A., Popova E.I., Zheleznova E.A. The structure of conditionally pathogenic microflora, isolated from the urogenital tract of women with pathological course of pregnancy. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020;65 (1): 50-54*

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-50-54

Information about authors:

Kozlov A.V., https://orcid.org/0000-0001-9384-6854
Lyamin A.V., https://orcid.org/0000-0002-5905-1895
Zhestkov A.V. https://orcid.org/0000-0002-3960-830X
Gusyakova O.A., https://orcid.org/0000-0002-5619-4583
Popova E.I. https://orcid.org/0000-0002-7249-1721
Zheleznova E.A. https://orcid.org/0000-0002-8208-0838

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*
Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 23.10.2019
Accepted 03.12.2019

Для корреспонденции: *Козлов Андрей Владимирович*, ассистент каф. фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой; e-mail: kozlov.biochemistry@yandex.ru

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-50-54

Введение. Беременность является одним из самых сложных физиологических процессов в организме женщины. На течение беременности влияет значительное количество экзо- и эндогенных факторов, многие из которых не поддаются точной оценке и прогнозированию. Среди эндогенных факторов, имеющих тесную взаимосвязь с течением процесса беременности, возникновением послеродовых осложнений, формированием иммунного статуса новорожденного, можно выделить микробиологический состав урогенитального тракта: цервикального канала, влагалища, уретры. Микрофлора данных локусов в зависимости от своего состава может служить либо фактором, поддерживающим течение нормальной беременности и послеродового периода, либо фактором агрессии [1].

Женский мочеполовой тракт является одной из самых разнообразных по микрофлоре сред в организме. Его микробный пейзаж отличается вариабельностью как качественного, так и количественного состава. Во время беременности в организме женщины происходят глобальные метаболические изменения, приводящие, в том числе, к изменению микробиоты мочеполовых путей [2]. Преобладающие в норме *Lactobacillus* spp. за счет выработки молочной кислоты и перекиси водорода поддерживают постоянство pH урогенитального тракта и препятствуют колонизации условно и облигатно патогенной флоры. Причем существует корреляция между биохимической активностью вида лактобацилл и склонностью к развитию у пациенток дисбиотических состояний слизистых оболочек урогенитального тракта [3]. Так, определенные виды лактобактерий (*L.crispatus, L.gasseri*) чаще встречаются при отсутствии бактериального вагиноза, а *L.inners* – у пациенток с бактериальным вагинозом. В целом, *Lactobacillus* spp. служит своего рода «идеальным компонентом» для данной микробиологической ниши, выполняя все функции для поддержания биохимических констант. Появление иных микроорганизмов может приводить к изменениям воспалительного характера или метаболическим нарушениям. В последнее время широко обсуждается роль *Streptococcus agalactiae* как причины развития послеродового сепсиса [4], возникновения хорионамнионитов [5], эндометритов [6], пренатальной гибели плода [7], отрицательного влияния на организм новорожденного [8].

Давно доказано отрицательное влияние *Staphylococcus aureus* на материнский организм и организм плода. Так, во время беременности одной из наиболее важных мишеней *S.aureus* являются плодные оболочки. Развитие хорионамнионитов ведет к разрыву плодных оболочек и наступлению преждевременных родов. Еще одно опасное влияние *S.aureus* может проявляться в нарушении иммунной толерантности системы «мать-плод» за счет активации цитокиновых реакций [9]. Плод и новорожденный ребенок не менее подвержен отрицательному влиянию *S.aureus*. К самым опасным состояниям, вызванным *S.aureus* относится сепсис новорожденных [10].

Мнение о коагулазонегативных стафилококках долгое время было некатегоричным: считалось, что они могут являться частью нормальной микрофлоры урогенитального тракта без ярких отрицательных воздействий на него. На данный момент роль микроорганизмов данной группы пересматривается, в том числе из-за увеличения числа гнойно-септических осложнений у новорожденных, обусловленных коагулазонегативными стафилококками [11]. Выяснено, что ферментативная активность некоторых штаммов *S.epidermidis* сильно приближена к активности *S.aureus* [12], что способствует возобновлению вопроса о роли коагулазоотрицательных стафилококков в микрофлоре урогенитального тракта.

Значение бактерий порядка *Enterobacteriales* в составе микробного пейзажа слизистых урогенитального тракта считается однозначным: наличие данных бактерий приводит к возникновению воспалительных заболеваний половых органов, способствует развитию восходящих инфекций почек [13], увеличивает риск осложнений в послеродовом периоде [14].

Также немаловажными участниками развития патологических процессов могут являться микроорганизмы рода *Enterococcu*s. Хотя в ряде случаев данные бактерии считаются частью нормальной микрофлоры слизистых оболочек, но могут выделяться в посевах у женщин с эрозией шейки матки [15], преждевременным излитием околоплодных вод [16], а также могут служить причиной послеродового эндометрита.

Таким образом, определение состава микробиоты женского мочеполового тракта во время и после беременности может значительно повлиять на прогнозирование и профилактику возникновения интра- и послеродовых осложнений, а также на развитие воспалительных заболеваний новорожденного.

Целью работы является оценка качественного и количественного состава микробиоты мочеполового тракта беременных женщин.

Материал и методы. Исследование проведено на базе микробиологического отдела КДЛ Клиник ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. Материал от пациенток собирался одноразовыми ватными тампонами, доставка в лабораторию собранного материала осуществлялась в стерильных одноразовых пробирках с транспортными средами. Посев материала проводили на плотные питательные среды: 5% кровяной агар, коммерческие хромогенные среды, среду Сабуро, агар Эндо. Инкубация посевов осуществлялось при температуре 37ºС в течение 48 часов. Для видовой идентификации использовался метод MALDI-ToF масс-спектрометрии при помощи масс-спектрометра Microflex LT (Bruker®).

Результаты и обсуждение. Всего за 2017 г. было проведено 1415 исследований, в 54,9% случаев выявлены положительные посевы. Долю положительных посевов составил материал из цервикального канала (81,1%) и моча (18,9%) беременных женщин.

Структура микробиоты цервикального канала представлена грамположительной (69,5%), грамотрицательной флорой (19,5%) и грибами (11%). В составе грамположительной флоры лидирующую позицию занимали *Staphylococcus* spp. (45,2%), *Enterococcus* spp. (28,4%), а также *Lactobacillus* spp. (20,5%). Среди стафилококков чаще выделялись коагулазонегативные виды (90,9%), преимущественно *S.haemolyticus* (45,5% от общего числа коагулазонегативных стафилококков). Среди *Enterococcus* spp. наиболее распространен *Enterococcus faecalis* (98,3%).

Разнообразен качественный состав *Lactobacillus* spp. Распространенными оказались *L.crispatus, L. gasseri u L.jensenii* , намного реже встречались такие виды, как *L.paracasei, L.rhamnosus, L.iners u L.lactis*. Преобладание *L.crispatus, L.gasseri* над количеством *L.iners* является благоприятным фактором для поддержания постоянства

микрофлоры цервикального канала и предотвращения заселения условно-патогенной флоры [18]. Диаграмма качественного и количественного состава *Lactobacillus* spp. представлена на рис. 1.

Грамотрицательная флора цервикального канала представлена в основном бактериями порядка *Enterobacteriales*, среди которых чаще выделялась *E.coli* (69,5%).

В 11% исследований материала из цервикального канала были найдены грибы рода *Candida*. Основным видом, определяемым в материале был *Candida albicans* (93,3%).

При анализе качественного и количественного состава микробиоты цервикального канала были замечены определенные особенности. Отмечалось значительное количество S*taphylococcus* spp. *и Enteroccocus* spp. при развитии послеоперационного сепсиса [18] и расхождении послеоперационных швов. Действительно, стафилококки могут являться причиной развития тяжелых септических осложнений,

Распределение микроорганизмов, выделенных из мочи, в зависимости от диагноза по МКБ-10

Диагноз по МКБ-10	Выделенные микроорганизмы , %	
Угрожающий аборт (О20.0)	порядок *Enterobacteriales*	38,5
	Enterococcus spp	23
	Staphylococcus spp	23
Инфекции (О23.0-4)	порядок *Enterobacteriales*	29,3
	Staphylococcus spp	25,2
	Enterococcus spp	22,4
Патология состояния плода, возможные трудности родоразрешения (О36.3, О47.0), преждевременные роды без родоразрешения (О60.0)	*Enterococcus spp*	28,6
	порядок *Enterobacteriales*	15,9
	Staphylococcus spp	6,4
Гипертоническая болезнь, протеинурия, отеки (О10, О13)	*Staphylococcus spp*	31,6
	Enterococcus spp	21
	Corynebacterium spp	15,8

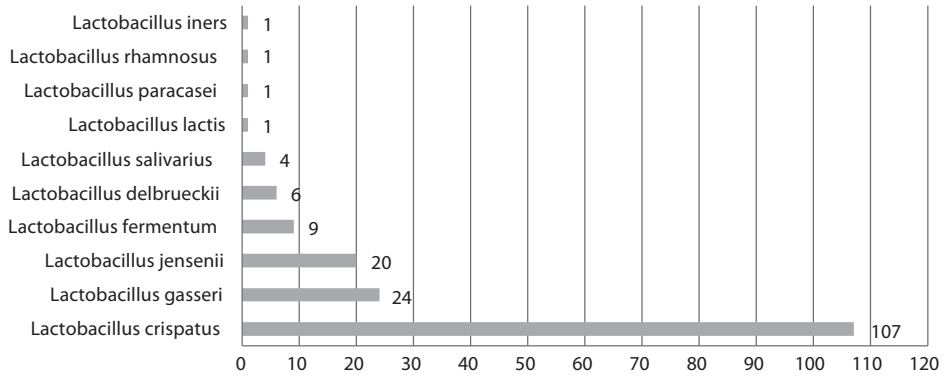


Рис.1. Качественный и количественный состав *Lactobacillus* spp., выделенных из цервикального канала.

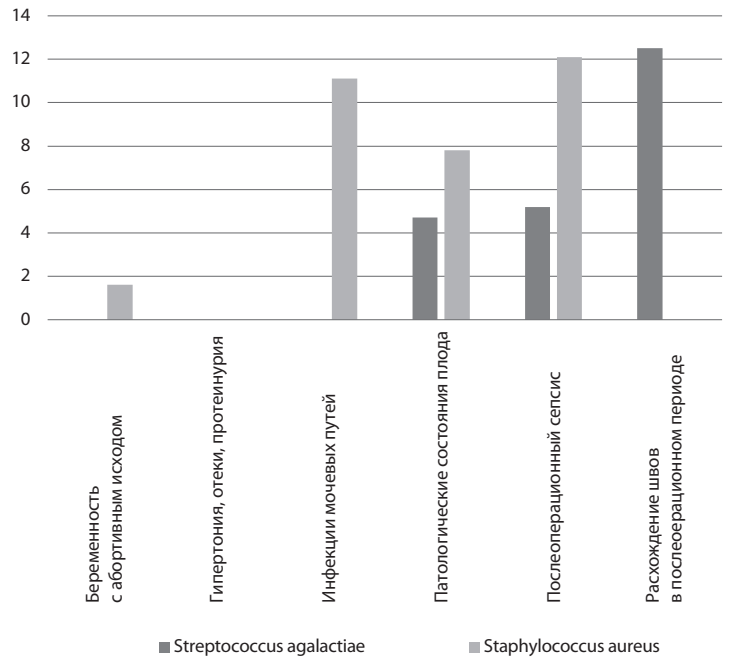


Рис.2 Распределение *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в зависимости от диагноза (в % от общего числа микроорганизмов, выделенных из цервикального канала).

причем в роли возбудителя могут выступать как *S.aureus*, так и коагулазонегативные виды [12]. Немаловажной является и роль *Enterococcus* spp. в развитии сепсиса, особенно у лиц с иммуносупрессией. Данные отечественных и зарубежных исследователей доказывают, что наличие *Enterococcus* spp. в цервикальном канале у лиц с ВИЧ-инфекцией может приводить к развитию бактериемии и последующих септических состояний [19].

Обращает на себя внимание сходство состава микрофлоры урогенитального тракта женщин, чья беременность отягощена наличием инфекций мочеполовых путей, и беременных с патологией плода или трудностями родоразрешения. Особенно важным является наличие в обеих группах достаточного количества *S.aureus*, являющего одной их основных причин патологий плода [5].

Одним из превалирующих по значимости является обнаружение *Streptococcus agalactiae* как причины развития патогенных процессов. Наибольшее его содержание было замечено у женщин с патологиями плода, трудностями родоразрешения (4,77%), послеоперационным сепсисом (5,17%) и расхождением швов в послеоперационном периоде (12,5%). Участие *S.agalactiae* как в развитии патологий плода и плодных оболочек, так и в развитии септических осложнений является доказанным [20]. Диаграмма с распределением *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в зависимости от диагноза (в % от общего числа микроорганизмов, выделенных из цервикального канала) представлена на рис.2.

Качественный микробиологический состав мочи был представлен грамположительной флорой (68,7%), грамотрицательной флорой (30,1%) и грибами рода *Candida* (1,2%). В структуре грамположительной флоры преимущественно выделялись *Staphylococcus* spp. (41,6%), *Enterococcus* spp. (34,6%). Заметно значительное преобладание коагулазонегативных стафилококков (97,3%) над коагулазоположительными (2,7%). Состав грамотрицательной флоры преимущественно представлен бактериями порядка *Enterobacteriales* (71,4%).

Был проведен анализ качественного и количественного микробиологического состава мочи, в результате которого были подведены итоги. Выявлены три наиболее часто встречающиеся группы бактерий в моче: *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., бактерии порядка *Enterobacteriales,* представленные преимущественно *E.coli*. *Staphylococcus* spp. достаточно часто встречались во всех группах диагнозов, причем их содержание варьировалось от 6,4 до 31,6% (см. таблицу).

При состояниях, сопровождающихся патологией плода, трудностях родоразрешения или преждевременных родах на первый план выходили бактерии рода *Enterococcus*. *E.coli* занимала же лидирующее по распространенности положение у пациенток, чья беременность была отягощена угрожающим абортом или инфекциями, тогда как при наличии начальных признаков преэклампсии полностью отсутствовала.

Заключение. Значение микрофлоры мочеполового тракта беременной женщины многогранно и определяется не только влиянием на организм самой женщины, но и взаимосвязанный с ним организм ребенка, поэтому регулярное микробиологическое обследование беременных женщин должно носить обязательный характер. Также ввиду постоянного обновления информации о микроорганизмах, относящихся к группе условно-патогенных бактерий, врач-клиницист, получая результат анализа должен обращать свое внимание не только на «классических» возбудителей, но и на условно-патогенную и нормальную микрофлору слизистых, ее качественный и количественный состав, оценивать возможные факторы патогенности.

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

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 4, 5, 7,9,10, 12, 19, 20 см. REFERENCES)

2. Урумбаева К.У., Бищекова Б.Н., Шукенова Э.К., Ракимжанова А., Наурызбаева Л., Амангельдыкызы С. и др. Микрофлора влагалища и цервикального канала у беременных. *Фармация Казахстана*. 2015; 4: 22-5.
3. Ворошилина Е.С., Плотко Е.Э., Хаютин Л.В., Тищенко Н.А., Зорников Д.Л. Преобладание *Lactobacillus iners* в микробиоценозе влагалища женщин с умеренным дисбиозом ассоциировано с наличием клинических признаков инфекционно-воспалительной патологии влагалища. *Вестник РГМУ.* 2017; 2:47-51.
6. Самойлова Т.Е., Кохно Н.И., Докудаева Ш.А. Микробные ассоциации при послеродовом эндометрите. *Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение.* 2018; 10: 6-13.
8. Мамедалиева Н.М., Исенова С.Ш., Сагидуллаева А.Х., Нариманова Ж.Н., Божбанбаева Н.С., Мустафина К.К., и др. Роль бета-гемолитического стрептококка в акушерской клинике (обзор литературы). *Фармация Казахстана*. 2017; 5: 35-9.
11. Беляева Е. В., Ермолина Г. Б., Борискина Е. В, Шкуркина И.С., Носова Т. В., Белова И. В., и др. Биологическая характеристика эковаров коагулазонегативных стафилококков, выделенных от новорожденных пациентов детского стационара. *Медицинский альманах.* 2016; 43 (3): 36-9.
13. Силенко О.Н., Кольцова Т.В., Савенкова Н.Д., Кутушева Г.Ф. Сочетанные микробно-воспалительные заболевания органов мочевой и половой систем у юных беременных. *Нефрология.* 2009; 13(1): 82-6.
14. Шляпников М.Е., Прохорова Л.В., Кияшко И.С., Соловова Л.Д., Денисова Н.Г., Сыресина С.В., Карпушина Е.Ю. Особенности современного течения раневой акушерской инфекции: от клинико-микробиологического мониторинга к рациональному профилактическому и лечебному назначению антимикробных препаратов. *Тольяттинский медицинский консилиум.* 2016; 1-2: 40-4.
15. Кунгурцева Е.А., Лещенко О.Я., Данусевич И.Н., Попкова С.М., Шабанова Н.М., Немченко У.М., Джиоев Ю.П. Микроэкология влагалища женщин с неспецифическими воспалительными заболеваниями гениталий и нарушениями репродуктивной функции. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.* 2013; 2-2 (90): 197-201.
16. Сорокина О. В., Мартикайнен З. М., Болотских В. М., Савичева А. М., Зайнулина М. С. Микробиоценоз влагалища у женщин с преждевременным излитием околоплодных вод при доношенном сроке. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*. 2012; 19(1): 99-105.
17. Синякова А.А. Современные представления о микробиоценозе влагалища и его влиянии на исходы беременности. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2017; 66(6): 89-110.
18. Баринов С.В., Блауман Е.С., Тирская Ю.И., Шкабарня Л.Л., Попова Л.Д., Медянникова И.В. Факторы риска развития и особенности течения послеродового эндометрита. *Мать и Дитя в Кузбассе.* 2017; 2 (69): 22-8.

REFERENCES

1. Dominguez-Bello M.G., De Jesus-Laboy K.M., Shen N., Cox L.M., Amir A., Gonzalez A., Bokulich N.A. et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nature Medicine.* 2016; 22(3): 250-3.
2. Urumbaeva K.U., Bisenova B.N., Shakenova, E.K., Rakhmanova A., Nauryzbaev L., Amangeldygaz S. et al. Microflora of the vagina and

cervical canal in pregnant women. *Farmatsiya Kazakhstana*. 2015; 4: 22-5.
3. Voroshilina E. S., Plotko E. E., Khayutin L. V., Tishchenko N. A., Zornikov D. L. the Predominance of Lactobacillus iners in the vaginal microbiocenosis of women with moderate dysbiosis is associated with the presence of clinical signs of infectious and inflammatory pathology of the vagina. *Vestnik RGMU*. 2017; 2: 47-51. (in Russian)
4. Dauby N., Adler C., Miendje Deyi V.Y. et al. Prevalence, Risk Factors, and Serotype Distribution of Group B Streptococcus Colonization in HIV-Infected Pregnant Women Living in Belgium: A Prospective Cohort Study. *Open Forum Infectious Diseases*. 2018; 5(12): ofy320.
5. Sorano S., Goto M., Matsuoka S., Tohyama A., Yamamoto H., Nakamura S. et al. Chorioamnionitis caused by Staphylococcus aureus with intact membranes in a term pregnancy: A case of maternal and fetal septic shock. *Journal of Infection and Chemotherapy.* 2016; 22(4): 261-4.
6. Samoylova T.E., Kohno N.I.., Dokudaeva S.Y.. Microbial associations in postpartum endometritis. *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Meditsinskoe obozrenie.* 2018; 10: 6-13. (in Russian)
7. Yadeta T.A., Worku A., Egata G., Seyoum B., Marami D., Berhane Y. Maternal group B Streptococcus recto vaginal colonization increases the odds of stillbirth: evidence from Eastern Ethiopia. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2018; 18(1): 410.
8. Mammadalieva N. M., isenova S. sh., Sagidullayeva A. H., Narimanova Zh. N., Bozhbanbayeva N. S., Mustafina K. K., et al. the Role of beta-hemolytic Streptococcus in obstetric clinic (literature review). *Farmatsiya Kazakhstana*. 2017; 5: 35-9.
9. Ryan S.D., Leslie A.K., Lauren M.T., Lisa M.R., David M.A., Jennifer A.G. *Staphylococcus aureus* Infection of human gestational membranes induces bacterial biofilm formation and host production of cytokines. *The Journal of Infectious Diseases*. 2017; 215(4): 653–7.
10. Sangita T., Lokendra B.S. Changing trend of neonatal septicemia and antibiotic susceptibility pattern of isolates in Nepal. *International Journal of Pediatrics*. 2019; 7 p. https://doi.org/10.1155/2019/3784529
11. Belyaeva E. V., Ermolina G. B., Boriskina E. V., Shkurkina I. S., Nosova T. V., Belova I. V., etc. Biological characteristics of ecovars of coagulase-negative staphylococci isolated from newborn patients of children's hospital. *Meditsinskiy al'manakh*. 2016; 43 (3): 36-9. (in Russian)
12. Dong Y., Speer C.P., Glaser K. Beyond sepsis: *Staphylococcus epidermidis* is an underestimated but significant contributor to neonatal morbidity. *Virulence*. 2018; 9(1): 621-33.
13. Silenko O. N., Koltsova T. V., Savenkova N. D., Kutusheva G. F. Combined microbial and inflammatory diseases of the urinary and reproductive systems in young pregnant women. *Nefrologiya*. 2009; 13 (1): 82-6. (in Russian)
14. Shlyapnikov M. E., Prokhorova L. V., Kiyashko I. S., Solovova L. D., Denisova N. G., Syresina S. V., Karpushina E. Yu. Features of the current course of wound obstetric infection: from clinical and microbiological monitoring to rational prophylactic and therapeutic use of antimicrobials. *Tol'yattinskiy meditsinskiy konsilium*. 2016; 1-2: 40-44. (in Russian)
15. Kungurtseva E. A., Leshchenko O. Ya., danusevich I. N., Popkova S. M., Shabanova N. M., Nemchenko U. M., Dzhioev Yu.P. microecology of the vagina of women with nonspecific inflammatory diseases of the genitals and reproductive disorders. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2013; 2-2 (90): 197-201. (in Russian)
16. Sorokina O. V., Martikainen Z. M., bolotskikh V. M., Savicheva A. M., zainullina M. S. vaginal Microbiocenosis in women with premature amniotic fluid effusion at full term. *Uchyenye zapiski SPbGMU im. akad. I.P. Pavlova*. 2012; 19 (1): 99-105. (in Russian)
17. Sinyakova A. A. Modern views on the microbiocenosis of the vagina and its influence on pregnancy outcomes. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2017; 66 (6):89-110. (in Russian)
18. Barinov S. V., Blauman E. S., tirskaya Yu. I., Shkabarnya L. L., Popova L. D., Medyannikova I. V. Risk factors and features of the course of postpartum endometritis. *Mat' i Ditya v Kuzbasse.* 2017; 2 (69): 22-8. (in Russian)
19. Ceci M., Delpech G., Sparo M., Mezzina V., Sánchez B.S., Baldaccini B. Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. The *Journal of Infection in Developing Countries*. 2015; 9(11): 1195-203.
20. Apgar B.S., Greenberg G., Yen G. Prevention of group B streptococcal disease in the newborn. *American Family Physician*. 2005; 71 (5): 903–10.

Поступила 23.10.19
Принята к печати 03.12.19

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-55-60

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Тамарова Э.Р.[1], Швец К.Ю.[1,2], Мавзютов А.Р.[1], Баймиев Ал.Х.[1,2], Булгакова А.И.[1]

СОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА

[1]ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ; 450000, Уфа, Россия;
[2]ФГБНУ Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, 450075, Уфа, Россия

Воспалительные заболевания пародонта представляют серьезную стоматологическую и общемедицинскую проблему в связи с высокой распространенностью среди взрослого населения, наличия клинических форм, приводящих к разрушению зубочелюстной системы и потере зубов, недостаточной эффективности лечения и частоты возникновения рецидивов заболевания, в том числе в связи с формированием биопленок.
Разработана молекулярно-генетическая тест-система для оценки содержания пародонтопатогенных микроорганизмов Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Streptococcus oralis, Streptococcus sanguis и Streptococcus sobrinus в содержимом пародонтальных карманов. Определены аналитические характеристики тест-системы, а также проведена апробация на клинических образцах больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести. Сконструированный диагностический набор позволил провести сравнительный анализ эффективности различных видов лечения воспалительных заболеваний пародонта на основе количественных данных содержания бактерий в содержимом пародонтальных карманов.

Ключевые слова: *пародонтит; пародонтопатогены; RT-PCR; количественный анализ; контроль эффективности лечения.*

Для цитирования: *Тамарова Э.Р., Швец К.Ю., Мавзютов А.Р., Баймиев Ал.Х., Булгакова А.И. Создание молекулярно-генетической тест-системы для ранней диагностики и оценки эффективности лечения воспалительных заболеваний пародонта. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1): 55-60. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-55-60*

Tamarova E.R. [1], Shvets K.Yu.[1,2], Mavzyutov A.R.[1], Baimiev Al.H.[1,2], Bulgakova A.I.[1]

CREATION OF A MOLECULAR GENETIC TEST SYSTEM FOR EARLY DIAGNOSTICS AND EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF TREATMENT OF INFLAMMATORY PERIODONTAL DISEASES

[1] Bashkir State Medical University, Ufa, Russia;
[2] Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center RAS, Ufa, Russia

Inflammatory periodontal diseases represent a serious dental and general medical problem due to the high prevalence among the adult population, the presence of clinical forms leading to the destruction of the dentition and tooth loss, insufficient treatment effectiveness and the frequency of relapse, including in connection with the formation of biofilms. A molecular genetic test system has been developed to evaluate the content of periodontopathogenic microorganisms Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Streptococcus oralis, Streptococcus sanguis and Streptococcus sobrinus in the contents of periodontal pockets. The analytical characteristics of the test system were determined, and testing was carried out on clinical samples of patients with chronic generalized periodontitis of moderate severity. The constructed diagnostic kit allowed us to conduct a comparative analysis of the effectiveness of various types of treatment of inflammatory periodontal diseases based on quantitative data on the content of bacteria in the contents of periodontal pockets.

Keywords: *periodontitis; periodontopathogens; RT-PCR; quantitative analysis; treatment effectiveness control.*

For citation: *Tamarova E.R., Shvets K.Yu., Mavzyutov A.R., Baimiev Al.Kh., Bulgakova A.I. Creation of a molecular genetic test system for early diagnosis and evaluation of the effectiveness of treatment of inflammatory periodontal diseases. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (1): 55-60 (in Russ.). DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-55-60*

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

Information about authors*:*

Tamarova E.R. – orcid.org/0000-0002-4871-0832
Shvets K.Yu. – orcid.org/0000-0001-8147-5566
Mavzyutov A.R. – orcid.org/0000-0001-5943-1882
Baimiev Al. H. – orcid.org/0000-0003-0605-6740
Bulgakova A.I. – orcid.org/0000-0001-7295-2877

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*
Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 19.11.2019
Accepted 09.12.2019

Для корреспонденции: *Мавзютов Айрат Радикович*, д-р мед. наук, зав. каф. фундаментальной и прикладной микробиологии, проф. каф. лаб. диагностики; e-mail: ufalab@mail.ru

Введение. Воспалительные заболевания пародонта представляют серьезную стоматологическую и общемедицинскую проблему в связи с высокой распространенностью среди взрослого населения, наличия клинических форм, приводящих к разрушению зубочелюстной системы и потере зубов, недостаточной эффективности лечения и частоты возникновения рецидивов заболевания, в том числе в связи с формированием биопленок [1-3]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) у лиц в возрасте 15–19 лет пародонтит регистрируется в 55–89% случаев, в возрасте 35–44 лет и в старших возрастных группах заболеваемость пародонтитом регистрируется уже в 65–98% [4-5].

Проблемы профилактики и повышения эффективности комплексного лечения воспалительных заболеваний пародонта представляют актуальную проблему современной стоматологии, поскольку все чаще встречаются клинические случаи, имеющие агрессивное, практически непрерывно рецидивирующее течение. Пародонтит как комплексное мультифакториальное заболевание характеризуется наличием медленных прогрессирующих процессов, в конечном итоге приводящих к утрате зубодесневого прикрепления [6]. С учетом анализа современных научных представлений о регулирующей роли иммунной системы в развитии патологических состояний в тканях пародонта, предопределяющим является формирование локального и системного иммунодефицитного состояния [7,8].

Между тем считается, что важнейшим пусковым фактором в инициации деструктивных процессов в тканях пародонта является постепенно формирующаяся в придесневых областях и межзубных промежутках бактериальная биопленка, представляющая стабильный микроконсорциум из нескольких сотен микроорганизмов. Входящие в состав биопленок бактерии покрывают каждую из анатомических поверхностей полости рта и отличаются интенсивной межклеточной коммуникацией и высоким уровнем горизонтальной передачи генов. В таком состоянии микроорганизмы лучше противостоят неблагоприятным факторам, защитным механизмам иммунной системы организма, а также действию антибактериальных веществ [9].

По мнению ряда авторов, главными патогенными микроорганизмами, вызывающими воспалительные заболевания пародонта, являются виды *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Tanerella forsythensis*и *Treponema denticola* [10-13]. Также к маркерам воспалительных заболеваний пародонта следует отнести облигатно анаэробные виды *Streptococcus spp.* (*S. mutans, S. milleri, S. mitis, S. oralis, S. downei, S. salivarius, S. sobrinus, S. sanguis*), составляющие около половины резидентной микрофлоры ротовой полости человека и являющиеся единственным видом бактерий полости рта, демонстрирующих высокую как внутриродовую, так и межродовую коаггрегацию [14].

В настоящее время количество идентифицированных видов бактерий на поверхности зубов и слизистой оболочки полости рта, находящихся в динамическом равновесии и формирующих соотвествующий микробиоценоз, превышает 700 [8,15,16]. Более половины представителей микробиоты полости рта не поддаются культивированию, поэтому данные о количественных соотношениях бактерий в настоящее время практически отсутствуют. Во многом последнее обусловлено недостаточной информативностью применяемых на современном этапе методов (микроскопических, бактериологических и др.), не позволяющих выявлять весь спектр анаэробных, микроаэрофильных и некультивируемых бактерий. Такая диагностика пародонтита в настоящее время ограничивается констатацией очага уже необратимой инфекционной деструкции ткани. В этой связи представляется целесообразным использование методов молекулярной биологии.

Современные высокопроизводительные молекулярно-генетические методы открывают широкие возможности в плане получения в короткий срок больших объемов количественных данных о содержании пародонтопатогенных микроорганизмов в клиническом материале, пригодных для статистического анализа. Соответственно подобные методы молекулярного анализа могут быть применены в диагностике, оценке и прогнозировании лечения пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта.

Цель исследования – разработка молекулярно-генетической тест-системы для оценки содержания пародонтопатогенных микроорганизмов в содержимом пародонтальных карманов, подбора адекватной антибиотикотерапии и оценки эффективности лечения воспалительных заболеваний пародонта.

Материал и методы. В группу наблюдения были включены 220 пациентов (79 мужчин и 141 женщина) в возрасте от 29 до 74 лет с диагнозом хронический генерализованный пародонтит (ХГП) средней степени тяжести. Критериями включения пациентов в исследование являлись: отсутствие выраженной сопутствующей соматической патологии и аллергических реакций, информированное согласие пациента на участие в исследовании и высокая степень комплаентности пациента. Критериями исключения из исследования явились: онкологические заболевания в анамнезе, беременность и лактация, острые инфекционные и вирусные заболевания, обострение хронических заболеваний, наличие аллергических реакций на компоненты используемых препаратов, прием лекарственных препаратов, влияющих на уровень костной резорбции и гипертрофию десен, низкая комплаентность больного, отказ больного от обследования.

Контрольную группу составили 100 пациентов (46 мужчин и 54 женщины) со здоровым пародонтом после санации полости рта.

Все пациенты, включенные в исследование, в полном объеме и в доступной форме были проинформированы о проводимых методах обследования и лечения. Каждым участником исследования было подписано добровольное информированное согласие на участие в нем.

Пациентам был проведен стандартный стоматологический осмотр с определением степени воспалительно-деструктивных процессов в тканях пародонта, характеризующихся наличием пародонтальных карманов, патологической подвижности зубов и кровоточивости десен при чистке зубов. Для объективной оценки клинического состояния пародонта врачом-пародонтологом дополнительно проводилась оценка гигиенических индексов (индекс Грина-Вермиллиона, индекс PMA, индекс CPITN), характеризующих гигиеническое состояние пародонта.

На следующем этапе был проведен инструктаж по чистке зубов, подбору индивидуальных средств гигиены полости рта, а также информирование и мотивирование по предстоящему лечению. Убедившись в правильности всех манипуляций, приступали к лечению.

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-55-60

Пациенты группы наблюдения были разделены на 3 группы в зависимости от выбранной тактики лечения. Пациентам первой группы (*n*=70) назначался стандартный курс антибиотикотерапии. Схема лечения – ежедневно однократное введение 1 мл 30% р-ра линкомицина гидрохлорида с 0,2 мл 2% р-ра лидокаина гидрохлорида (ex tempore) по переходной складке полости рта один раз в день, по 0,6 мл с правой и левой стороны, поочередно на верхней и нижней челюсти.

Пациентам второй группы (*n*=80) назначалось однократное терапевтическое воздействие ультразвуком при помощи прибора «Vector» («DurrDental», Германия) на поверхности зубодесневых карманов и корня. Данная терапия предназначена для минимально инвазивного лечения воспалительных заболеваний пародонта, а также для микроинвазивного препарирования твердых тканей зуба и финишной обработки реставраций. Стоит заметить, что Vector-терапия не назначалась пациентам, имевшим следующие противопоказания: наличие кардиостимуляторов, заболеваний крови, первые 6 мес после перенесенного инфаркта миокарда, операции на сетчатке глаза, тяжелый сахарный диабет, операции по трансплантации органов, хронические инфекционные заболевания. В подобных случаях перед назначением соответствующей терапии пародонтита проводилась консультация с лечащим врачом.

Третьей группе пациентов (*n*=80) назначалась комплексная терапия, включающая ультразвуковое воздействие при помощи прибора «Vector» и стандартный курс антибиотикотерапии. Курс лечения во всех трех группах составлял 14 дней.

В ходе проведения лечения у пациентов с ХГП делали забор клинического материала – содержимого пародонтальных карманов для проведения молекулярно-генетического исследования. Содержимое пародонтального кармана отбирали стерильным бумажным эндодонтическим штифтом (размер № 25), который вводили пинцетом в пародонтальный карман в наиболее глубокие участки на 10 секунд и затем помещали в стерильную пластиковую пробирку типа Eppendorf (1,5 мл), содержащую 1 мл физиологического раствора. Отбор проводили в двукратно для каждого пациента. Транспортировали образцы в лабораторию при +4°С в течение 2 ч в термоконтейнерах с хладагентом. Молекулярно-генетическое исследование с целью количественного определения содержания пародонтопатогенных микроорганизмов *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Streptococcus oralis, Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus* в содержимом пародонтальных карманов проводили в момент включения пациентов в исследование и через 10 дней после начала курса терапии.

Для выделения тотальной ДНК микроорганизмов использовали ионообменную смолу Chelex100, приготовленную с использованием следующих реагентов: Triton X-100 (1%), Tween-20 (1%), Chelex 100, TRIS-HCl (pH 9,1, 100 мМ), крезоловый красный, ddH_2O. Для постановки ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР) использовали пары видоспецифичных праймеров к фрагментам ДНК исследуемых микроорганизмов и 2,5х-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ»), согласно инструкции производителя. ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch “REAL TIME” (Bio-Rad, США). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Реакцию амплификации проводили в 25 мкл смеси, содержащей 10 мкл 2,5х реакционной смеси ПЦР-Микс SYBR Green I, 8 мкл ddH_2O, 2 мкл каждого из пары праймеров и 3 мкл тотальной ДНК. Процедуру проведения ПЦР-анализа оптимизировали путем использования в качестве матрицы десятикратных разведений ДНК рекомбинантной плазмиды pAL-TAStrSob16S (концентрация двухцепочной ДНК 2,48 мкг/мл ($7{,}08\times10^{11}$ ГЭ/образец)), сконструированной путем встраивания участка гена 16S рРНК пародонтопатогенного микроорганизма *Streptococcus sobrinus* в вектор pAL-TA («Евроген», Москва) с последующей трансформацией и наработкой плазмиды в клетках *E.coli* XL1Blue.

Результаты и обсуждение. *Определение аналитических характеристик диагностической тест-системы*. Первым этапом совершенствования диагностической тест-системы, разработанной для количественного определения содержания пародонтопатогенных бактерий *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Streptococcus oralis, Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus* в клиническом материале, стало проведение оценки аналитической чувствительности и специфичности диагностического набора.

Оценку аналитической чувствительности проводили с использованием

созданных стандартных контрольных образцов, содержащих фрагменты ДНК пародонтопатогенных микроорганизмов *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Streptococcus oralis, Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus*. Аналитическую чувствительность диагностической тест-системы определяли методом пробит-анализа. Результаты оценки аналитической чувствительности РТ-ПЦР представлены на рис. 1.

По результатам ПЦР десятикратных разведений пяти стандартных контрольных образцов в буферном растворе, содержащих от 70 до 10^7 копий фрагментов ДНК каждого возбудителя в 1 мл. На уровне доверительной вероятности 95% ($p < 0{,}05$) чувствительность анализа составила 70 геном-эквивалентов в исследуемой пробе при эффективности амплификации 98 % (рис. 2).

Далее была проведена работа по определению аналитической специфичности тест-системы. Для этого тестировали образцы, содержащие ДНК микроорганизмов *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. При пятикратном исследовании каждой пробы получили только отрицательные результаты. Отрицательные результаты РТ-ПЦР анализа с каждым из вышеперечисленных образцов позволяют оценить специфичность тест-системы по использованной выборке образцов как 100%.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами был разработан и сконструирован новый диагностический набор реагентов для выявления и количественного определения содержания пародонтопатогенных микроорганизмов *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, Streptococcus oralis, Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus* в клиническом материале от больных пародонтитом методом ПЦР в режиме реального времени. Показано, что данный набор обладает высокой специфичностью, чувствительностью и позволяет надежно выявлять ДНК указанных выше пародонтопатогенов в концентрации 70 ГЭ/образец в клинических образцах.

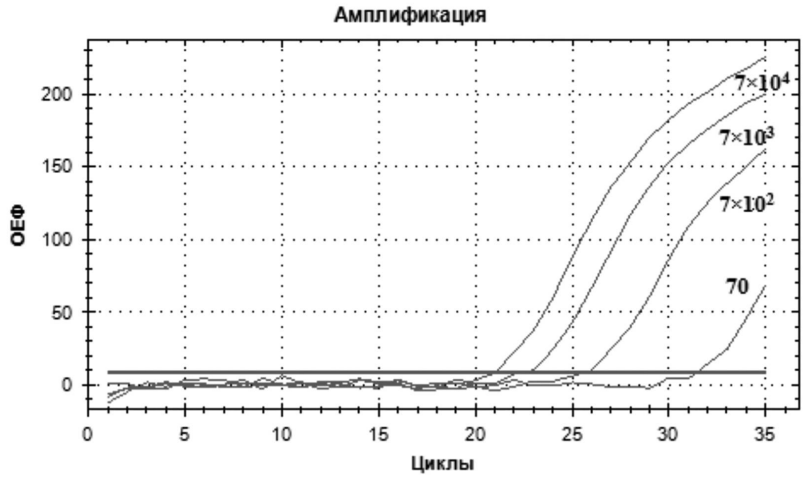


Рис. 1. Флуоресцентный профиль четырех разведений (70-7×10^4 ГЭ/образец) стандартного образца фрагмента генома *Streptococcus sobrinus* в зависимости от количества циклов ПЦР при оценке чувствительности выявления ДНК *Streptococcus sobrinus* и линейный диапазон ее измерения методом РТ-ПЦР.

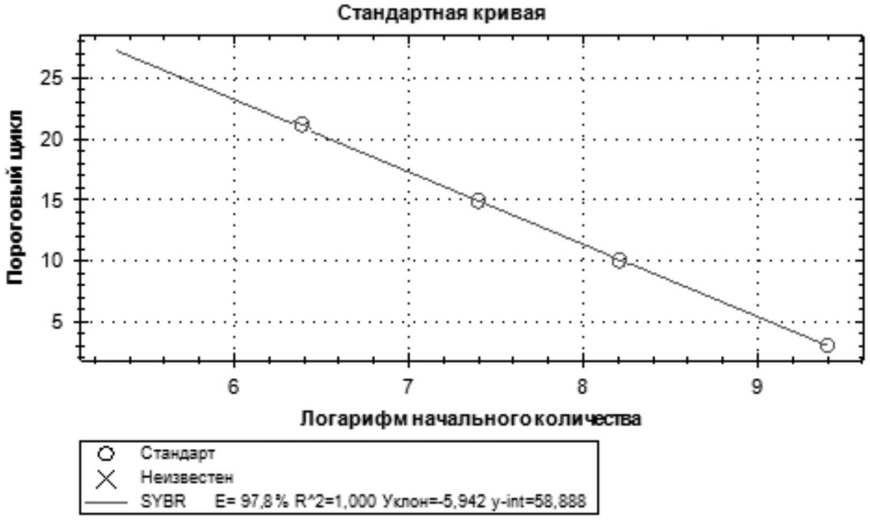


Рис. 2. Стандартная кривая корреляции между значениями Ct и log10 концентрации специфической матрицы при оценке чувствительности выявления ДНК *Streptococcus sobrinus* и линейный диапазон ее измерения методом РТ-ПЦР.

Апробация диагностической тест-системы на клинических образцах больных ХГП средней степени тяжести. Исследование количественного содержания пародонтопатогенных бактерий в выравненных по объему клинических образцах методом ПЦР в режиме реального времени проводили на приборе, откалиброванном тремя разведениями сконструированной рекомбинантной плазмиды pAL-TAStrSob16S (концентрация двухцепочной ДНК составила 2,48 мкг/мл или 7,08x10^{11} копий ДНК/мл). Использование калибровочных образцов позволяло определять абсолютное количество ген-эквивалента ДНК возбудителя в образце (ГЭ/образец).

Расчет абсолютной концентрации пародонтопатогенных бактерий *Porphyromona sgingivalis, Treponema denticola, Streptococcus oralis, Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus* в исследуемых образцах проводили с учетом объемов клинических образцов при заборе материала по модифицированной нами формуле:

$X_o = 1{,}7 \times X_{or} \times (1+E)^{Ct_{or} - Ct_o}$, где:

1,7 – коэффициент для соответствующего перерасчета;

X_o – концентрация матриц исследуемого образца (ГЭ/образец);

X_{or} – стандартная начальная концентрация (копий ДНК/мл);

E – эффективность РТ-ПЦР;

Ct_{or} – пороговый цикл для стандартного образца;

Ct_o – пороговый цикл для исследуемого образца.

Количественное определение содержания пародонтопатогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов позволило сделать вывод о том, что по мере утяжеления клинических признаков заболевания наблюдается тенденция к увеличению видового состава и количественного содержания бактерий в клиническом материале. Количественная оценка содержания пародонтопатогенных микроорганизмов в группах больных ХГП с разными схемами лечения позволила установить

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-55-60

Изменение абсолютного количества (ГЭ/образец) пародонтопатогенных бактерий в СПК у больных ХГП средней степени тяжести в ходе использования различных тактик лечения

Бактерии	Содержимое пародонтальных карманов	
	до лечения	Через 10 дней
	Антибиотикотерапия (n=70)	
Porphyromonas gingivalis	$7{,}18\times10^{7}$	$2{,}1\times10^{5*}$
Treponema denticola	$6{,}3\times10^{7}$	$1{,}2\times10^{5*}$
Streptococcus oralis	$3{,}8\times10^{8}$	$4{,}3\times10^{5*}$
Streptococcus sanguis	$4{,}7\times10^{8}$	$3{,}9\times10^{7}$
Streptococcus sobrinus	$1{,}4\times10^{9}$	$4{,}01\times10^{8}$
	Ультразвуковая терапия при использовании прибором «Vector» (n=80)	
Porphyromonas gingivalis	$1{,}6\times10^{7}$	$7{,}1\times10^{5*}$
Treponema denticola	$9{,}3\times10^{8}$	$2{,}9\times10^{6*}$
Streptococcus oralis	$8{,}7\times10^{8}$	$1{,}3\times10^{7}$
Streptococcus sanguis	$9{,}8\times10^{8}$	$8{,}3\times10^{5*}$
Streptococcus sobrinus	$1{,}5\times10^{9}$	$7{,}3\times10^{5*}$
	Комплексная терапия (курс антибиотиков и ультразвуковое лечение прибором «Vector») (n=70)	
Porphyromonas gingivalis	$1{,}04\times10^{8}$	$5{,}7\times10^{5*}$
Treponema denticola	$2{,}5\times10^{9}$	$4{,}8\times10^{6*}$
Streptococcus oralis	$2{,}4\times10^{8}$	$9{,}7\times10^{4*}$
Streptococcus sanguis	$4{,}3\times10^{8}$	$1{,}7\times10^{5*}$
Streptococcus sobrinus	$4{,}4\times10^{9}$	$8{,}8\times10^{5*}$

Примечание. * – достоверность различий показателей в ходе лечения ($p< 0{,}05$).

связь между изменением представленности пародонтопатогенных видов в пародонтальных карманах и прогрессированием инфекционно-воспалительных процессов в тканях пародонта.

В группе больных, проходивших курс системной антибиотикотерапии, наблюдалось статистически значимое снижение концентрации пародонтопатогенов *Porphyromonas gingivalis*в содержимом пародонтальных карманов. После проведения курса терапии средняя концентрация пародонтапатогенного вида составляла $2{,}1\times10^{5*}$ ГЭ/образец. Аналогичные изменения концентраций наблюдались и в отношении видов *Treponema denticola* и *Streptococcus oralis*. Усредненные концентрации при этом составляли $1{,}2\times10^{5*}$ ГЭ/образец и $4{,}3\times10^{5*}$ ГЭ/образец соответственно (см.таблицу). Таким образом, нами в количественном варианте подтверждается значение *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola,* выступающих в качестве важнейших этиологических агентов, способных инициировать воспалительные процессы в тканях пародонта, а возможно и других тканей челюстно-лицевой области [17-19].

При обработке результатов количественного молекулярно-генетического анализа содержания пародонтопатогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов у группы пациентов, пролеченных с использованием ультразвуковой стоматологической системы Vector (DurrDental, Германия), были получены данные, указывающие на статистически значимое снижение абсолютного количества пародонтопатогенных видов *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus sanguis* и *Streptococcus sobrinus* (см.таблицу).

Существенное уменьшение концентрации исследуемых видов бактерий происходило сразу на несколько порядков. Последнее еще раз подтверждало все сведения об эффективности применения ультразвукового лечения для разрушения бактериальной биопленки при лечении воспалительных заболеваний пародонта. По мнению большинства авторов [4,21,22], действенность аппарата обеспечивается за счет эффекта кавитации, при котором антимикробный эффект обеспечивается ультразвуковыми волнами, а промывающий раствор при этом удаляет из пародонтальных карманов микробную массу.

Проведенный анализ клинической эффективности применения ультразвукового лечения пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести показал, что по окончании курса терапии у пациентов наблюдается улучшение пародонтограммы: уменьшение глубины пародонтальных карманов (от 5 до 2 мм), уменьшение подвижности зубов, приобретение упругости десны, отсутствие гиперемии десны, появление уплотненного зубодесневого прикрепления.

Включение в ультразвуковое лечение больных ХГП средней степени тяжести антибиотикотерапии позволило не только существенно снизить общую бактериальную нагрузку на ткани пародонта, но и значительно уменьшить количественное содержание в составе пародонтальных карманов всех исследуемых пародонтопатогенов. Аналогично наблюдалось снижение общей бактериальной обсемененности пародонтальных карманов и снижение концентрации пародонтопатогенов на несколько порядков.

Заключение. Анализируя результаты клинического обследования пациентов после лечения, мы отмечали, прежде всего, сокращение сроков купирования воспалительных процессов в десне и достижение стабильной ремиссии. Терапевтическое воздействие ультразвуком при помощи прибора «Vector» на поверхности корня и зубодесневых карманов в сочетании с антибиотикотерапией приводило к эрадикации или к достоверному снижению абсолютного количества пародонтопатогенных микроорганизмов, а также более быстрому восстановлению физиологической функции пародонта. Таким образом, разработанная диагностическая тест-система для количественного определения содержания пародонтопатогенных микроорганизмов позволила провести сравнительный анализ эффективности различных видов лечения воспалительных заболеваний пародонта на основе количественных данных содержания пародонтопатогенных видов в содержимом пародонтальных карманов.

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

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 5, 10-19 см. REFERENCES)

1. Безрукова И.В. *Агрессивные формы пародонтита*. М.: МИА; 2002.
2. Грудянов А.И., Овчинникова В.В. Частота выявления различных представителей пародонтопатогенной микрофлоры при пародонтите различной степени тяжести. *Стоматология*. 2009; 3: 34-7.
3. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический

пародонтит, кандида-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(12): 59-64.
6. Ламонт Р.Дж. Микробиология и иммунология для стоматологов. М.: Практическая медицина; 2010.
7. Луцкая И.К. Болезни пародонта. М.: Медицинская литература; 2010.
8. Зайрятьянц О.В., Бойкова С.П., Смольянникова В.А. Роль иммунокомпетентных клеток десны, Toll-like рецепторов и других молекулярных механизмов в патогенезе воспалительно-деструктивных заболеваний пародонта. *Пародонтология.* 2007; 3(44): 12-20.
9. Грудянов А.И., Фоменко Е.Ф. Этиология и патогенез воспалительных заболеваний пародонта. М.: МИА; 2010.
20. Миронов А.Ю., Пашков Е.П., Черноглазова Е.М. Видовой и количественный показатели микрофлоры при флегмонах челюстно-лицевой области. *Стоматология*. 1988; 67(5): 42-43.
21. Царев В.Н., Ушаков Р.В. Антимикробная терапия в стоматологии. М.: Литтерра; 2004.
22. Баймиев А.Х., Швец К.Ю., Мавзютов А.Р., Тамарова Э.Р., Булгакова А.И. Количественный анализ микробиоты пародонтальных карманов и слюны ПЦР в режиме реального времени до и после лечения пародонтита. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017; 35(3): 103-8.

REFERENCES

1. Bezrukova I.V. *Aggressive forms of periodontitis.* Moscow: MIA; 2010. (in Russian)
2. Grudyanov A.I., Ovchinnikova V.V. Frequency of revelation of different representatives of parodontopathogenic microflora in cases of parodontitis of different severity. *Stomatologiya*. 2009; 3: 34-7. (in Russian)
3. Ippolitov E.V., Didenko L.V., Tsaryov V.N. The morphology of the periodontal biofilm in inflammatory gum diseases (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, candida-associated periodontitis) according to electron microscopy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(12): 59-64. (in Russian)
4. Kolenbrander P.K., Andersen R.N., Blehert D.S. Communication among Oral Bacteria. *Journal microbiology and molecular biology reviews*. 2002; 66(3): 486-505.
5. Corraini P., Baelum V., Pannuti C.M., Romito G.A., Aquino D.R., Cortelli S.C., Cortelli J.R. Subgingival microbial profiles as diagnostic markers of destructive periodontal diseases: A clinical epidemiology study. *Pustiglioni Acta Odontol. Scand.* 2012; 4: 167-71.
6. Lamont R.D. Microbiology and immunology for dentists [Mikrobiologiya I immunologiya dlya stomatologov]. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2010. (in Russian)
7. Lutskaya I.K. Periodontal Disease [Bolezni parodonta]. Moscow: Meditsinskaya literatura; 2010. (in Russian)
8. Zayratyants O.V., Boykova S.P., Smolyannikova V.A. Role of immunocompetence gingiva cells, Toll-like receptors and other molecular mechanisms in inflammatory-destructive periodontal diseases pathogenesis. *Parodontologiya.* 2007; 3(44): 12-20. (in Russian)
9. Grudyanov A.I., Fomenko E.F. Etiology and pathogenesis of inflammatory periodontal diseases [Etiologiya I patogenez vospalitel´nykh zabolevaniy parodonta]. Moscow: MIA; 2010. (in Russian)
10. Eke PI. High PCR copy-counts of periodontal pathogens in saliva are associated with periodontal disease status. *J. Evid Based Dent. Pract*. 2011; 11(4): 208-9.
11. Mori Y., Yoshimura A., Ukai T. Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol*. 2003; 18(1): 54-8.
12. Redanz S.A., Standar K., Podbielski A., Kreikemeyer B. Five-Species Transcriptome Array for Oral Mixed. *Biofilm Studies*. 2011; 6(12): 178-82.
13. Amin M., Ho A.C.S., Lin J.Y., Batista da Silva A.P., Glogauer M., Ellen R.P. Induction of de novo subcortical actin filament assembly by *Treponema denticola* major outer sheath protein. *Infect. Immun.* 2004; 72: 3650-4.
14. Gamboa F., García D.A., Acosta A. Presence and antimicrobial profile of gram-negative facultative anaerobe rods in patients with chronic periodontitis and gingivitis. *Acta Odontol. Latinoam*. 2013; 26(1): 24-30.
15. Rasmussen L., Hanstrom L., Lerner U.H. Characterization of bone resorbing activity in gingival crevicular fluid from patients with periodontitis. *J. Clin. Periodontol*. 2000; 27(1): 41-52.
16. Tedjosasongko U., Kozai K. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery. ASDC. *J. Dent. Child*. 2002; 69: 284–8.
17. Conrads G., de Soet J.J., Song L., Henne K. Comparing the cariogenic species Streptococcus sobrinus and S. mutans on whole genome level. *Journal of Oral Microbiology.* 2014; 6: 1-13.
18. Salvetti E., Torriani S., Felis G.E. The Genus Lactobacillus: A Taxonomic Update. *Probiotics &Antimicro. Prot*. 2012; 4: 217–26.
19. Amano A., Nakagawa I., Okahahi N. Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *Journal of Periodontal Research*. 2004; 39(2): 136-42.
20. Mironov A.Yu., Pashkov E.P., Chernoglazova E.M. Species and quantitative indicators of microflora in phlegmons of the maxillofacial region. *Stomatologiya*. 1988; 67(5): 42-3. (in Russian)
21. Tsaryov V.N., Ushakov R.V. Antimicrobial therapy in dentistry [Antimikrobnaya terapiya v stomatologii]. Moscow: Litterra; 2004. (in Russian)
22. Baymiev A.K., Shvets K.Y., Mavzyutov A.R., Tamarova Ye.R., Bulgakova A.I. Quantitative analysis of the microbiota of periodontal pockets and saliva by real-time PCR before and after treatment of periodontitis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya I virusologiya.* 2017; 32: 155-9. (in Russian)

Поступила 19.11.19
Принята к печати 09.12.19

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-61-66

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Останкова Ю. В.[1], Семёнов А. В.[1,2,3], Зуева Е.Б.[1], Ногойбаева К.А.[4], Касымбекова К.Т.[4], Тобокалова С.Т.[4], Тотолян Арег А.[1,2]

РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ МУТАЦИЙ ВИРУСА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ В

[1]ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197191, Санкт-Петербург, Россия;
[2]ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;
[3]ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава РФ, 191015, Санкт-Петербург, Россия;
[4]Киргизский государственный медицинский институт переподготовки и повышения квалификации, 720040, Бишкек, Кыргызская Республика

Проанализирована распространённость клинически значимых мутаций вируса у больных хроническим вирусным гепатитом В из Киргизской Республики. Использованы образцы плазмы крови 64 больных с верифицированным хроническим вирусным гепатитом В, полученные от коренных жителей Кыргызстана. Проведена асимметричная ПЦР с протяжёнными олигонуклеотидами и дальнейшим использованием продукта амплификации первой реакции в новой ПЦР с одной из пар внутренних (гнездовых) перекрывающихся праймеров, совместно фланкирующих полный геном ВГВ, с последующим секвенированием. На основании филогенетического анализа 64 изолятов ВГВ, полученных от пациентов из Киргизской Республики показано, что в обследованной группе присутствует только вирус генотипа D, преобладал ВГВ субгенотипа D_1 (68,75%) по сравнению с ВГВ субгенотипа D_2 (18,75%) и субгенотипа D_3 (12,5%). Для всех субгенотипов очевидны несколько независимых источников инфицирования, выделяются субкластеры, включающие изоляты из Кыргызстана, Казахстана, Узбекистана, субкластеры, включающие изоляты только из Кыргызстана, имеющие меньшее сходство с ранее депонированными в международную базу данных изолятами, что, вероятно, свидетельствует о независимой гомологичной эволюции ВГВ в регионе.
Клинически значимые мутации выявлены у 26,5% пациентов. В том числе 12,5% с escape-мутациями, препятствующими выявлению вируса и/или позволяющими вирусу реплицироваться, несмотря на вакцину (122K, 128V, 133I, 134N). Ещё 12,5% изолятов характеризуются мутациями, независимо ассоциированными с развитием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы, в том числе делециями протяжённостью 21, 24, 27 нуклеотидов в Pre-S2 регионе и мутацией S11F в PreCore регионе. В одном случае обнаружены необычные мутации 236S и 250P в позициях, описанных как сайты лекарственной устойчивости P-области, связанные с развитием резистентности к адефовиру, тенофовиру, энтекавиру.
Анализ генетической структуры вируса гепатита В, раннее выявление мутаций вируса у больных ХВГВ могут способствовать правильному выбору стратегии вакцинации, противовирусной и иммуносупрессивной терапии, прогнозированию клинического течения и прогрессирования заболевания.

Ключевые слова: *хронический вирусный гепатит В; мутации лекарственной устойчивости; мутации вакцинного бегства; делеции Pre-S; прогностические маркеры; гепатоцеллюлярная карцинома.*

Для цитирования: *Останкова Ю. В., Семёнов А. В., Зуева Е. Б., Ногойбаева К. А., Касымбекова К. Т., Тобокалова С. Т., Тотолян Арег А. Распространённость клинически значимых мутаций вируса у больных хроническим вирусным гепатитом В. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1): 61-66 DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-61-66*

Ostankova Yu. V.[1], Semenov A. V.[1,2,3], Zueva E.B.[1], Nogoybaeva K.A.[4], Kasymbekova K.T.[4], Tobokalova S.T.[4], Totolian Areg A.[1,2]

THE PREVALENCE CLINICALLY SIGNIFICANT VIRUS MUTATIONS AMONG PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS B

[1]Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia;
[2]Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I. P. Pavlov, 197022, Saint Petersburg, Russia;
[3]North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, 191015, Saint Petersburg, Russia;
[4]Kyrgyz State Medical Institute of Retraining and Skill, 720040, Bishkek, Kyrgyz Republic

The prevalence of clinically significant virus mutations in patients with chronic viral hepatitis B from the Kyrgyz Republic was analyzed. Blood plasma samples of 64 patients with verified chronic viral hepatitis B obtained from Kyrgyzstan indigenous people were used in the work. Asymmetric PCR was carried out with extended oligonucleotides and the first reaction amplification product was further used in a new PCR with one of the nested pairs overlapping primers that flanked the entire HBV genome together, followed by sequencing. Based on the phylogenetic analysis of 64 HBV isolates obtained from patients from the Kyrgyz Republic, it was shown that only the genotype D virus was present in the examined group, the HBV subgenotype D1 (68.75%) prevailed compared with the HBV subgenotype D2 (18.75%) and subgenotype D3 (12.5%). For all subgenotypes, several independent infection sources are obvious, subclusters that include isolates from Kyrgyzstan, Kazakhstan and Uzbekistan are distinguished, as well as subclusters that include isolates only from Kyrgyzstan, which are less similar to isolates previously deposited in the international database, which probably indicates an independent HBV homologous evolution in the region.
Clinically significant mutations were identified in 26.5% of patients. Including 12.5% with escape mutations that prevent the virus detection and / or allow the virus to replicate despite the vaccine (122K, 128V, 133I, 134N). Another 12.5% of the isolates are characterized by mutations that are independently associated with the liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma development,

Для корреспонденции: *Останкова Юлия Владимировна*, канд. биол.наук, науч. сотр. лаб. мол. иммунологии; e-mail: shenna1@yandex.ru

including 21, 24, 27 nucleotides deletions in the Pre-S2 region and the S11F mutation in the PreCore region. In one case, unusual 236S and 250P mutations were found in the positions described as drug resistance sites of the P region associated with the resistance development to adefovir, tenofovir, and entecavir.
The hepatitis B virus genetic structure analysis, early virus mutations detection in patients with chronic hepatitis B virus can help to choose the right vaccination strategy, antiviral and immunosuppressive therapy, as well as predict the clinical course and disease progression.

K e y w o r d s : *chronic hepatitis B; drug resistance mutations; vaccine escape mutations; Pre-S deletions; prognostic markers; hepatocellular carcinoma.*

For citation: *Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Zueva E.B., Nogoybaeva K.A., Kasymbekova K.T., Tobokalova S.T., Totolian Areg A. The prevalence clinically significant virus mutations among patients with chronic viral hepatitis B. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (1): 61-66 (in Russ.) DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-61-66*

For correspondence*: Ostankova Yu.V.,* PhD researcher at the Laboratory of Molecular Immunology; e-mail: shenna1@yandex.ru

Information about authors:

Ostankova Yu.V. http://orcid.org/0000-0003-2270-8897
Semenov A.V. https://orcid.org/0000-0003-3223-8219
Zueva E.B. https://orcid.org/0000-0002-0579-110X
Kasymbekova K.T. https://orcid.org/0000-0002-4383-350X
Totolian Areg A. https://orcid.org/0000-0003-4571-8799

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 06.12.2019
Accepted 16.12.2019

Введение. Седьмой по значимости причиной смертности в мире являются гепатотропные вирусы, способные вызывать как острые, так и хронические заболевания [1]. Более 47% смертей, причиной которых становятся вирусные гепатиты, связаны с вирусом гепатита В (ВГВ) [2]. Более чем у 240 млн человек, инфицированных вирусом гепатита В развивается хронический вирусный гепатит В (ХВГВ), представляющий собой диффузно-воспалительное заболевание, связанное с персистенцией ВГВ [3].

Клинические проявления ХВГВ многообразны и зависят от биологических свойств вируса и его взаимодействия с иммунной системой хозяина. Длительность заболевания, уровень вирусной нагрузки и его изменения с течением времени, мутации вируса, экологические и генетические факторы, этническая принадлежность и пол пациента могут влиять на течение заболевания [4].

Генетическая эволюция ВГВ определяется двумя важными особенностями жизненного цикла вируса. Во-первых, высокая генетическая стабильность ВГВ достигается за счёт чрезвычайно эффективного использования короткого генома. Наличие перекрывающихся рамок считывания, многочисленных регуляторных, репликативных, морфогенетических элементов, отсутствие некодирующих областей ограничивает формирование жизнеспособных мутаций ВГВ. Во-вторых, использование обратной транскриптазы без 3'→5'-корректирующей функции при репликации ВГВ определяет высокую частоту мутаций (более 2*10^-5 замен оснований/сайт в год), которые могут появляться во всех четырёх генах из-за спонтанных ошибок вирусной полимеразы или вследствие давления со стороны иммунной системы хозяина, или из-за экзогенных факторов, включая иммунизацию или лечение противовирусными препаратами [5, 6].

Способы лечения ВГВ продемонстрировали способность задерживать прогрессирование заболевания при использовании препаратов прямого противовирусного действия, однако многие пациенты не могут достичь цели лечения, что связано с мутациями лекарственной устойчивостью как после длительного применения терапии, так и у терапевтически-наивных больных за счёт инфицирования фармакорезистентными штаммами.

Ряд мутаций в регионе Pre-S1/Pre-S2/S ведут к ускользанию вируса от нейтрализующих антител и способствуют инфицированию вакцинированных людей [7]. В том числе такие мутации, как D144A, Q129R, G145R, отвечающие не только за развитие лекарственной устойчивости вируса, но и способные снижать связывание с анти-HB_s при вакцинации против гепатита В, минуя нейтрализующую активность этих антител. Происходит это за счёт изменений аминокислотных остатков в области детерминанты а поверхностного антигена способных определять конформационные изменения, которые могут позволить репликацию мутантных вирусов у вакцинированных людей (мутации вакцинного ускользания). Такие вирусы могут быть не обнаружены с помощью современных диагностических тест-систем, что представляет потенциальную угрозу безопасности гемотрансфузий. Выявляют варианты ВГВ с мутациями вакцинного ускользания по всей нуклеотидной последовательности детерминанты, потенциально способные уклониться от нейтрализующих анти-HB_s [8]. Мутации вакцинного ускользания могут возникать и без отбора, вызванного вакцинацией или терапией анти-ВГВ иммуноглобулином, а только за счёт факторов хозяина. В мире с возрастающей обеспокоенностью обсуждают растущую распространённость ВГВ с мутациями вакцинного ускользания с момента запуска программ универсальной вакцинации и возможность того, что эти мутантные вирусы могут использовать преимущества вируса дикого типа в преодолении иммунитета вакцинированных людей. Вызывает серьёзную обеспокоенность: заменят ли они вирус дикого типа и помешают ли программам вакцинации.

Согласно данным литературы, некоторые мутации ВГВ могут служить прогностическими маркёрами развития гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), являющейся второй ведущей причиной смертности от рака и одной из самых распространённых злокачественных

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-61-66

опухолей, особенно широко представленной в некоторых районах Азии и Африки [9]. Повышенный риск развития ГЦК показан у носителей ВГВ с мутациями региона PreCore (PC) G1896A и промотора базального ядра A1762T, G1764A, при наличии делеций в Pre-S области вируса [10].

Вышеуказанное свидетельствует о недостаточности выявления и генотипирования ВГВ, необходимо внедрять в рутинную лабораторную диагностику идентификацию различных мутаций вируса, способных служить прогностическими маркёрами развития заболевания.

Цель работы - выявление клинически значимых мутаций вируса у больных ХВГВ из Киргизской Республики.

Материал и методы. Исследование одобрено комитетом по этике ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург). Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. В работе использована плазма крови 64 больных с верифицированным ХВГВ, полученная от коренных жителей Киргизской Республики.

Экстракцию ДНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва), согласно инструкции. Для получения нуклеотидной последовательности полных геномов вируса проводили асимметричную ПЦР с использованием протяжённых олигонуклеотидов, на втором этапе проводили ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и одной из пар внутренних (гнездовых) перекрывающихся праймеров, совместно фланкирующих полный геном ВГВ, как показано ранее [11]. Для ПЦР использован следующий состав амплификационной смеси: 3-30 пМ каждого олигопраймера, 0,6-1,0 мМ каждого дезоксинуклеотида, 6,7 мМ $MgCl_2$, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-HCl, (рН 8,8), 200 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объёма 30 мкл. Амплификацию в общем виде проводили при следующих условиях: после денатурации при 95° С в течение 5 мин устанавливали 30-40 циклов амплификации в режиме: 95° С – 20-40 с, 55-65° С – 20-30 с, 72° С – 30-90 с; финальная элонгация при 72° С – 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1xTBE), окрашенном бромистым этидием.

Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США) на прямых и обратных праймерах в трёх повторах. Анализ продуктов секвенирующей реакции проводили с использованием генетического анализаторп ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США).

Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов осуществлён с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проведено в программе MEGA 7.0, используя алгоритм ClustalW [12]. Для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа рассматривали расстояния между последовательностями методом присоединения соседей, позволяющим оптимизацию дерева в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции» (Neighbor-joining), для оценки достоверности построенных деревьев проведён бутстреп (bootstrap) для 1000 повторов.

Для выявления возможной рекомбинации изолятов выполнен анализ с использованием инструмента генотипирования NCBI [13] и программного обеспечения RDP4 [14].

Результаты и обсуждение. Для всех исследуемых образцов получены нуклеотидные последовательности полного генома вируса удовлетворительного качества, пригодные для дальнейшего анализа. Для всех образцов определены генотип и субгенотип вируса.

На основании филогенетического анализа 64 изолятов ВГВ, полученных от пациентов из Киргизской Республики показано, что в обследованной группе присутствует только вирус генотипа D. При этом преобладал ВГВ субгенотипа D_1 (68,75%) по сравнению с ВГВ субгенотипа D_2 (18,75%) и субгенотипа D_3 (12,5%). При анализе нуклеотидных последовательностей полных геномов ВГВ на рекомбинации с использованием инструментов генотипирования NCBI и программы RDP4 рекомбинации не выявлены. При анализе последовательностей изолятов процент нуклеотидной идентичности субгенотипов D_1, D_2, D_3 составил 98,4±1,06%, 99,2±0,4%, 98,3±0,7%, соответственно. Филогенетические отношения между исследованными изолятами и референсными последовательностями представлены на рис. 1.

Уровень заболеваемости ХВГВ в Кыргызстане составляет 23 на 100 тыс. человек, наблюдается рост заболеваемости ВГВ (до 71 на 100 тыс. человек в Иссык-Кульской области) [15]. По другим данным распространённость ВГВ в Киргизской Республике составляет 10,3% [16]. Отмечается рост заболеваемости ХВГВ, доминирующими путями передачи ВГВ в стране являются парентеральный и бытовой (60,9%) с частым формированием семейных очагов (23,8%) [17]. Существует несколько факторов, способствующих формированию семейных очагов: очень низкий уровень вакцинации против ВГВ среди взрослого населения, отсутствие ревакцинации подростков и должного внимания к носителям ВГВ. За счёт этого от 2 до 6 членов семьи могут быть вовлечены в инфекционный процесс в семейном очаге, что требует углублённого обследования жителей республики для раннего выявления пациентов с ХВГВ и усиления профилактических мероприятий [18]. По всей видимости, это является одной из причин широкой распространенности заболеваемости ХВГВ среди детей (причём распространённость коинфекции ХВГВ + ХВГД выше, чем ХВГВ), несмотря на то, что дети до 15 лет охвачены вакцинацией против ВГВ [19]. Хотя оценка распространённости ХВГВ в Киргизской Республике представлена в данных литературы, информации о распределении генотипов/субгенотипов и характеристике генетической структуры вируса в регионе найти не удалось.

Обращает внимание сравнительно высокая для данного географического региона встречаемость ВГВ субгенотипа D_2. В более раннем исследовании мы сообщали о следующем распределении субгенотипов ВГВ среди жителей Киргизской республики: ВГВ D_1 73,34%, ВГВ D_2 3,33%, D_3 23,33% [20]. В настоящей работе очевидно сравнительное увеличение доли субгенотипа D_2 и уменьшение доли D_3, однако достоверных отличий не выявлено (p=0,07). При этом среди штаммов ВГВ D_2 выделяется субкластер (KYR33-KYR35, KYR38-KYR43) с нуклеотидной идентичностью 99,4±0,5%, изоляты

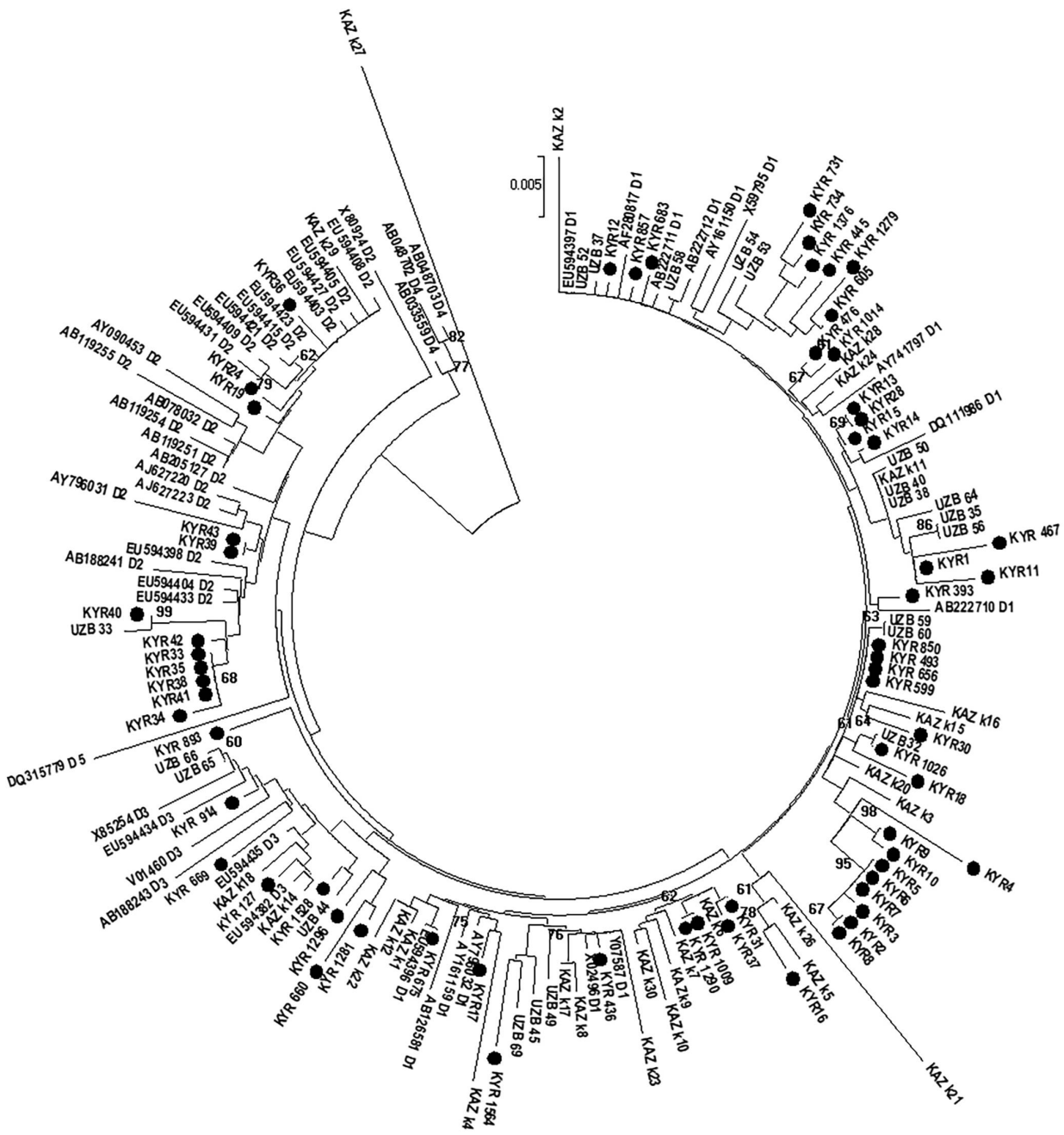


Рис. 1. Филогенетическое дерево исследованных изолятов ВГВ, выделенных от пациентов с ХВГВ, проживающих на территории Киргизской Республики, в сравнении со штаммами ВГВ, описанными нами ранее в странах Средней Азии, а также с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями генотипа D. Референсные последовательности обозначены кодами GenBank с указанием субгенотипа. Кружками обозначены образцы, исследованные в настоящей работе. Даны значения bootstrap ≥60%.

которого имеют высокое сходство с геновариантами ВГВ, широко распространёнными по всей территории РФ. Главную роль в кластеризации играет не столько географическая общность, сколько пути передачи инфекции, особенно когда речь идёт о распространении нехарактерного для региона геновариантa вируса после внедрения. По всей видимости, в данном случае имел место однократный завоз распространившегося позднее штамма.

Ветвь, соответствующая ВГВ D_3 разделилась на подкластеры. Предполагаем, что один из них связан с заражением посредством употребления инъекционных наркотических веществ. Пациенты из данной группы социально обеспеченные женщины, что, казалось бы, противоречит предположению о заражении в среде потребителей инъекционных наркотиков. По некоторым данным в настоящее время возраст большего числа употребляющих наркотики в Кыргызстане составляет около

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-61-66

HBV D1	A	C	A	A	G	A	T	C	C	C	A	G	A	G	T	G	A	G	A	G	G	C	C	T	G	T	A	T	T	T	T	C	C	T	G	C	T	G
KYR2	G	C	A	A	A	A	T	C	C	C	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G
KYR3	G	C	A	A	G	A	T	C	C	C	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G
KYR5	G	C	A	A	G	A	T	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G
KYR6	G	C	A	A	G	A	T	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G
KYR7	G	C	A	A	G	A	T	C	C	C	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G
KYR8	G	C	A	A	A	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G
KYR9	G	C	A	A	G	A	T	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G
KYR10	G	C	A	A	G	A	T	C	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	T	G

Рис. 2. Представлены нуклеотидные последовательности фрагмента Pre-S региона с делециями различной протяженности, выявленными в изолятах ВГВ обследованной группы, в сравнении с ВГВ субгенотипа D1 дикого типа.

30-45 лет, что соответствует среднему возрасту пациентов в группе, большинство из них дети обеспеченных родителей, инфицированные на рубеже XX-XXI веков, когда употребление инъекционных наркотиков получило широкое распространение в странах бывшего СССР. Смертность женщин среди употребляющих инъекционные наркотики значительно выше, чем мужчин [21].

Характерный для региона ВГВ субгенотип D_1, очевидно, имеет несколько независимых источников инфицирования. Выделяются субкластеры, включающие изоляты из Казахстана, Кыргызстана, Узбекистана. Субкластер, для которого, несмотря на разные географические регионы, очевиден общий инфекционный предок (процент нуклеотидной идентичности 99,6±0,3%) включает изоляты KYR31, KYR37, KYR1009, KYR1290, KAZk6, KAZk7, KAZk9, KAZk10, KAZk30. Сходство изолятов с описанными в международной базе данных образцами из разных стран является, по всей видимости, подтверждением многочисленных независимых завозов вируса в страны Средней Азии, в том числе в ходе крупных миграционных волн. Определяются субкластеры, включающие изоляты только из одной страны и имеющие меньшее сходство с ранее депонированными в международную базу данных изолятами, что, вероятно, свидетельствует о независимой гомологичной эволюции ВГВ в регионе.

Клинически значимые мутации выявлены у 17 пациентов, что составило 26,5%.

При анализе нуклеотидных последовательностей участка гена *Pol* генома ВГВ, ответственного за развитие лекарственной устойчивости вируса, не выявлены мутации фармакорезистентности, однако у одного больного в двух позициях, описанных в литературе как сайты лекарственной устойчивости P-области, связанные с развитием резистентности к адефовиру, тенофовиру, энтекавиру, обнаружены необычные мутации – 236S и 250P.

В обследуемой группе выявлены 8 случаев (12,5%) с escape-мутациями, влияющими на одну или несколько функций, в том числе мутации, препятствующие выявлению вируса (R122K, M133I, 134N), мутации, ограничивающие возможность терапии (IG) – M133I, мутации, позволяющие вирусу реплицироваться, несмотря на вакцину – 128V, M133I, 134N. Сходный уровень распространённости escape-мутантов показан среди больных ХВГВ в Иордании (18,9%), Иране (14%) [22, 23].

Обращают внимание 8 штаммов (12,5%), сформировавших субкластер ВГВ субгенотипа D_1 (изоляты KYR2, KYR3, KYR5-KYR10), существенно отличающийся от остальной группы. Нуклеотидная идентичность внутри кластера составляет 99,25±0,46%. Данные изоляты характеризуются делециями, протяжённостью 21, 24, 27 нуклеотидов в Pre-S2 регионе, представленными на рис. 2. Нуклеотидные последовательности полных геномов ВГВ с делециями в регионе Pre-S депонированы в международную базу данных GeneBank под номерами MN780900-MN780907.

Pre-S-область ВГВ расположена на 5'-конце открытых рамок считывания поверхностного гена и состоит из доменов Pre-S1 и Pre-S2. Pre-S-область содержит стартовые кодоны для экспрессии больших и средних поверхностных антигенов HBV (LHBs и MHBs соответственно) и промотор для экспрессии небольших поверхностных антигенов ВГВ (SHBs). Делеции Pre-S1 и Pre-S2 способны вызывать накопление белков LHBs и вирусных частиц в эндоплазматической сети (ER) и впоследствии вызывать стресс ER и окислительное повреждение ДНК гепатоцитов, инфицированных ВГВ, которые могут участвовать в гепатокарциногенезе. LHBs и укороченный MHBs признаны активаторами транскрипции, которые могут инициировать передачу сигналов Ras / Raf-1 / ERK и запускать иной онкогенный механизм. Всё это, как и выявление связанных с ГЦК делеций Pre-S у больных по меньшей мере за 10 лет до развития ГЦК, причём среди пациентов, у которых в дальнейшем развилась ГЦК, достоверно чаще, чем у пациентов без неё [24], позволило предположить канцерогенную роль Pre-S-делеций и возможность их потенциального применения в прогнозировании риска ГЦК.

У двух пациентов помимо делеций выявлена в Pre-Core регионе мутация S11F, независимо ассоциированная с развитием цирроза печени и ГЦК.

17 пациентов из обследуемой группы больных ХВГВ должны находиться под пристальным контролем лечащих врачей, так как в одной подгруппе больных возможно отсутствие ответа на терапию, в другой подгруппе высока вероятность развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы.

Заключение. Высокий уровень распространённости ХВГВ в Киргизской Республике свидетельствует о недостаточности диагностических и профилактических мер в регионе. Полученные данные о представленности клинически значимых мутациях вируса свидетельствуют о необходимости проведения высокочувствительной молекулярной диагностики гепатита В в связи с необходимостью правильного выбора стратегии вакцинации, противовирусной, иммуносупрессивной терапии. Анализ генетической структуры ВГВ, раннее выявление

мутаций вируса у больных ХВГВ могут способствовать прогнозированию клинического течения и прогрессирования заболевания.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

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

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-10, 16, 18, 21-24 см. REFERENCES)

11. Останкова Ю. В., Семёнов А. В., Тотолян Арег А. Выявление вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2019; 64 (10): 635-40.
12. Ногойбаева К. А., Тобокалова С. Т., Касымбекова К. Т., Заирова Г. М. Динамика заболеваемости хроническим гепатитом В в форме моноинфекции и в сочетании с гепатитом D в Кыргызской Республике за период 2010-2012 гг. *Казанский медицинский журнал.* 2014; 95 (6): 921-4.
13. Тобокалова С.Т., Бекенова Д.С., Заирова Г.М., Нурматов З.Ш., Назарбаева Ж.Н., Айтиева Ж.Т. Эпидемиологические особенности острого и хронического гепатитов В в Кыргызской Республике за 20-летний период (1997-2017 гг.). *Казанский медицинский журнал.* 2018; 99(6): 986-93.
14. Ногойбаева К.А., Касымбекова К.Т., Тобокалова С.Т., Мурзаева А.Т. Заболеваемость детей хроническими вирусными гепатитами В и D, 2010-2013гг., Кыргызстан. *Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева.* 2015; 4: 139-41.
15. Семёнов А. В., Останкова Ю. В., Ногойбаева К.А., Касымбекова К.Т., Лаврентьева И. Н., Тобокалова С. Т., Тотолян Арег А. Особенности молекулярной эпидемиологии сочетанной инфекции ВГВ/ВГД в Кыргызстане. *Инфекция и Иммунитет*. 2016; 6(2): 141-50.

REFERENCES

1. Van Nguyen D., Van Nguyen C., Bonsall D., Ngo T.T., Carrique-Mas J., Pham A.H. et al. Detection and Characterization of Homologues of Human Hepatitis Viruses and Pegiviruses in Rodents and Bats in Vietnam. *Viruses.* 2018; 10(3): E102.
2. Dong Hyun Sinn, Eun Ju Cho, Ji Hoon Kim, Do Young Kim, Yoon Jun Kim, Moon Seok Choi. Current status and strategies for viral hepatitis control in Korea. *Clin. Mol. Hepatol.* 2017; 23(3): 189-95.
3. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>. Accessed 2019.07.08.
4. Baumert T. F., Thimme R., von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol*. 2007; 13: 82-90.
5. Buti M., Rodriguez-Frias F., Jardi R., Esteban R. Hepatitis B virus genome variability and disease progression: the impact of pre-core mutants and HBV genotypes. *J. Clin. Virol.* 2005; 34(1): S79-S82.
6. Lin C.-L., Kao J.-H. Hepatitis B Virus Genotypes and Variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015; 5(5): a021436-a021436.
7. Chakravarty R., Neogi M., Roychowdhury S., Panda C.K. Presence of hepatitis B surface antigen mutant G145R DNA in the peripheral blood leukocytes of the family members of an asymptomatic carrier and evidence of its horizontal transmission. *Virus Res.* 2002; 90: 133-41.
8. Tao J., Zhang W., Yue H., Zhu G., Wu W., Gong W., Fang H., He G., Hu X., Zhao H., Liu A. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Shenzhen, China, 2015-2018. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 13948.
9. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65(2): 87-108.
10. Chen B.F., Liu C.J., Jow G.M., Chen P.J., Kao J.H., Chen D.S. High prevalence and mapping of pre-S deletion in hepatitis B virus carriers with progressive liver diseases. *Gastroenterology.* 2006; 130(4): 1153-68.
11. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolian Areg A. Hepatitis B virus identification in a blood plasma at a low viral load. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (10): 635-40. (in Russian)
12. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molec. Biology and Evolution.* 2016; 33(7): 1870-4.
13. Rozanov M., Plikat U., Chappey C., Kochergin A., Tatusova T. A web-based genotyping resource for viral sequences. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(Web Server issue): W654-9.
14. Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 2015; 1(1): vev003.
15. Nogoybaeva K.A., Tobokalova S.T1, Kasymbekova K.T., Zairova G.M. Rends for incidence of chronic hepatitis B monoinfection and chronic hepatitis B+D co-infection in the Kyrgyz Republic for the period of 2010-2012. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 95 (6): 921-4. (in Russian)
16. Kmet Lunaček N., Poljak M., Matičič M. Distribution of hepatitis B virus genotypes in Europe and clinical implications: a review. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2018; 27(3): 141-6.
17. Tobokalova S.T., Bekenova D.S., Zairova G.M., Nurmatov Z.Sh., Nazarbaeva Zh.N., Aytieva Zh.T. Epidemiological features of acute and chronic hepatitis B in the Kyrgyz Republic over the 20-year period (1997-2017). *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 99(6): 986-93. (in Russian)
18. Tobokalova S., Zairova G., Nogoibaeva K., Bekenova D. Clinical and epidemiological characteristics of family foci of chronic hepatitis B. *The Collection of Scholarly Papers.* London. 2016; 234-9.
19. Nogoybaeva K.A., Kasymbekova K.T., Tobokalova S.T., Murzaeva A.T. Children's chronic viral hepatitis morbidity in A and D, 2010-2013, Kyrgyzstan. *Vestnik KGMA im. I.K. Akhunbayeva*. 2015; 4: 139-41.
20. Semenov A.V., Ostankova Julia V., Nogoybaeva K.A., Kasymbekova K.T., Lavrentieva I.N., Tobokalova S.T., Totolian Areg A. Molecular epidemiology features of HBV/HDV co-infection in Kyrgyzstan. *Infektsiya i immunitet*. 2016; 6(2): 141-50. (in Russian)
21. Zabransky T., Mravcik V., Talu A., Jasaitis E. Post-Soviet Central Asia: a summary of the drug situation. *Int. J. Drug Policy.* 2014; 25(6): 1186-94.
22. Ababneh N.A., Sallam M., Kaddomi D., Attili A.M., Bsisu I., Khamees N., Khatib A., Mahafzah A. Patterns of hepatitis B virus S gene escape mutants and reverse transcriptase mutations among genotype D isolates in Jordan. *Peer J.* 2019; 7:e6583.
23. Moradi A., Zhand S., Ghaemi A., Javid N., Tabarraei A. Mutations in the S gene region of hepatitis B virus genotype D in Golestan Province-Iran. *Virus Genes*. 2012; 44(3): 382-7.
24. Zhang A.Y., Lai C.L., Huang F.Y., Seto W.K., Fung J., Wong D.K., Yuen M.F. Evolutionary Changes of Hepatitis B Virus Pre-S Mutations Prior to Development of Hepatocellular Carcinoma. *PloS One.* 2015; 10(9): e0139478.

Поступила 06.12.19
Принята к печати 16.12.19

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-67-72

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Петруша О.А., Файзулоев Е.Б.

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК

ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Россия

Метод петлевой изотермической амплификации ДНК (LAMP) был разработан T. Notomi с соавт. в 2000 г. и, благодаря своей точности, чувствительности и простоте исполнения, стал одним из самых перспективных методов для осуществления диагностики на месте лечения («point-of-care»). В настоящем обзоре рассмотрены разные способы детекции результатов реакции LAMP, выявлены их преимущества и недостатки. Методы детекции результатов LAMP могут быть условно подразделены на косвенные и прямые. К косвенным методам, направленным на выявление изменений в химическом составе реакционной смеси, можно отнести турбидиметрию в реальном времени, флуоресцентную детекцию с кальцеином, колориметрическую детекцию с гидроксинафтоловым синим и детекцию с использованием модифицированных наночастиц золота. Прямые методы, основанные на выявлении накопления в процессе реакции ампликонов, включают в себя флуориметрическое выявление ампликонов с применением интеркалирующих красителей, резонансный перенос энергии флуоресценции, иммуноферментный анализ, реакцию иммунохроматографии, использование катионных полимеров и наночастиц золота.

Для разработок в области диагностики «point-of-care» характерна выраженная тенденция к миниатюризации, проведению реакции LAMP на микрочипах и микрофлюидных устройствах с электрохимическим или оптическим способом детекции.

Наиболее перспективными для диагностики инфекционных заболеваний являются методы турбидиметрии и использование интеркалирующих красителей. Разработка отечественных портативных приборов для детекции результатов LAMP, основанных на флуоресцентной детекции или турбидиметрии в реальном времени будет способствовать широкому внедрению метода в практику клинической лабораторной диагностики.

Поиск литературы проводился в базе данный Pubmed ncbi по ключевым словам.

Ключевые слова: *быстрая молекулярная диагностика; инфекционные заболевания; петлевая изотермическая амплификация ДНК; LAMP; методы детекции; обзор литературы.*

Для цитирования: *Петруша О.А., Файзулоев Е.Б. Методы детекции результатов реакции петлевой изотермической амплификации ДНК. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1): 67-72. DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-67-72*

Petrusha O.A., Faizuloev E.B.

DETECTION METHODS FOR RESULTS OF A LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

The loop mediated isothermal amplification (LAMP) was developed by T. Notomi et al. in 2000. It has become one of the most promising methods for point-of-care diagnostics due to its accuracy, sensitivity and ease of execution. In this review, various methods for detecting the results of the LAMP reaction are considered; their advantages and disadvantages are revealed. Methods for detecting LAMP results can be divided into indirect and direct. Indirect methods aimed at detecting changes in the chemical composition of the reaction mixture include real-time turbidimetry, fluorescence detection with calcein, colorimetric detection with hydroxynaphthol blue, and detection using modified gold nanoparticles. Direct methods based on the detection of accumulation amplicons during the reaction include fluorimetric detection with intercalating dyes, resonance fluorescence energy transfer, enzyme immunoassay, immunochromatography, using cationic polymers and gold nanoparticles.

The development in the field of point-of-care diagnostics is characterized by a pronounced tendency to miniaturization, the LAMP reaction on microchips and microfluidic devices with an electrochemical or optical detection method.

The most promising for the diagnosis of infectious diseases are turbidimetry methods and the use of intercalating dyes. The development of portable domestic instruments for detecting of LAMP results based on real-time fluorescence detection or turbidimetry will contribute to the widespread introduction of the method into clinical laboratory diagnostic practice.

A literature research was conducted in the Pubmed ncbi based on keywords.

Keywords: *rapid molecular diagnostics; infectious diseases; loop-mediated isothermal amplification of DNA; LAMP; detection methods; review.*

For citation: *Petrusha O.A., Faizuloev E.B. Detection methods for results of a loop-mediated isothermal amplification of DNA Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (1):67-72 (in Russ.). DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-67-72*

For correspondence: *Petrusha Olga,* junior researcher of Molecular Virology Laboratory; e-mail: petrusha.olga@gmail.com

Information about authors:

Petrusha O.A. - https://orcid.org/0000-0002-5022-7962

Faizuloev E.B. - https://orcid.org/0000-0001-7385-5083

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 03.12.2019
Accepted 09.12.2019

Для корреспонденции: *Петруша Ольга Александровна,* мл. науч. сотр. лаб. молекулярной вирусологии; e-mail: petrusha.olga@gmail.com

Введение. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), благодаря своей универсальности, высокой специфичности и чувствительности стал «золотым стандартом» молекулярной диагностики многих инфекционных заболеваний, как в медицине, так и в ветеринарии. Однако применение метода ПЦР для диагностики на месте оказания медицинской помощи («point-of-care»), в походно-полевых условиях или в животноводческих хозяйствах крайне затруднительно. Высокая потребность в средствах диагностики «point-of-care» заставляет искать подходящие методы, в числе которых особый интерес представляют методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот (ИАНК).

На данный момент описано более десяти методов ИАНК [1], из которых наиболее часто применяются методы транскрипционной амплификации РНК NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), амплификация по типу катящегося кольца RCA (Rolling Circle Amplification), хеликазо-зависимая амплификация HDA (Helicase-Dependent Amplification) и метод петлевой изотермической амплификации ДНК LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification). Последний, на наш взгляд, представляет особый интерес. Метод LAMP был разработан T. Notomi с соавт. в 2000 г. [2]. В состав реакционной смеси LAMP как правило входит ДНК-полимераза термофильной бактерии Bacillus stearothermophilus (Bst ДНК-полимераза), которая обладает 5'-3'-ДНК-полимеразной активностью, способностью к замещению (вытеснению) цепей ДНК и не проявляет 5'-3'-экзонуклеазной активности. Благодаря использованию Bst ДНК-полимеразы, реакция LAMP проходит при постоянной температуре и не требует применения термоциклера. Продукты реакции накапливаются в количестве, многократно превышающем количество продуктов ПЦР, что позволяет проводить визуальную детекцию результата прямо в пробирке. В классическом варианте LAMP в состав реакционной смесит входит четыре олигонуклеотидных праймера, что обеспечивает высокую специфичность метода, при чувствительности, сопоставимой с ПЦР.

За рубежом такие компании как Eiken Chemical (Япония) и OptiGene (Великобритания) выпускают коммерческие наборы реагентов на основе метода LAMP для использования в диагностике инфекционных заболеваний, мониторинга окружающей среды и оценки безопасности продуктов питания. Для детекции результатов LAMP предложено большое разнообразие методов.

В настоящем обзоре рассмотрены разные способы детекции результатов реакции LAMP, выявлены их преимущества и недостатки. Методы детекции результатов LAMP можно условно подразделить на косвенные, направленные на выявление изменений в химическом составе реакционной смеси, и прямые, основанные на выявлении накопления в процессе реакции ампликонов.

Косвенные методы детекции. Турбидиметрия в реальном времени. Турбидиметрический метод возможен благодаря чрезвычайно высокому выходу продуктов реакции LAMP. Во время полимеризации молекулы ДНК из нуклеотидов высвобождается ион пирофосфата, который затем вступает в реакцию с ионами Mg2+ из реакционного буфера, в результате чего образуется пирофосфат магния, который выпадает в осадок (рис.1, *а,* см.обложку). Именно на образовании нерастворимого осадка и взаимодействии с ионами пирофосфата основан турбидиметрический метод детекции реакции LAMP.

На следующий год после публикации статьи, в которой впервые описывался метод LAMP, вышла работа Y. Mori и соавт. [3], предложившего для детекции результатов метод турбидиметрии. В процессе реакции амплификации увеличивается мутность раствора, по изменению которой судят о ходе реакции. Для образования осадка концентрация пирофосфата в реакционной смеси должна превышать 0,5 мМ. Согласно исследованиям Y.Mori, в реакции LAMP концентрация иона пирофосфата в 2,5 раза превышает необходимый минимум, а в реакции ПЦР составляет всего 0,02 мМ, чего недостаточно для образования осадка. Также в этом исследовании была доказана зависимость увеличения мутности раствора от накопления ДНК-продукта LAMP, т.е. возможность проводить детекцию результата в режиме реального времени. В 2004 г. та же группа ученых представила устройство, способное поддерживать постоянную температуру для проведения реакции LAMP и одновременно измерять мутность нескольких образцов в режиме реального времени. Измерение мутности проводят каждые 30 с в течение 60 минут [4]. В дальнейшем, метод LAMP с турбидиметрической детекцией в реальном времени показал высокую эффективность в исследованиях по диагностике инфекционных заболеваний [5-7], причем чувствительность измерений соответствовала таковой для ПЦР-РВ. К недостаткам турбидиметрического метода детекции можно отнести риск снижения чувствительности, к которой приводят такие факторы как неравномерность пространственного распределения частиц и их размера, повторное растворение Mg2P2O7 и снижение мутности раствора. Также сложности связаны с необходимостью детекции результатов в небольших объемах реакционной смеси.

Флуоресцентная детекция с кальцеином. Простой способ визуальной детекции с использованием металлоиндикатора кальцеина предложен в 2008 г. N. Tomita и соавт. [8]. В начале реакции кальцеин образует комплекс с ионом марганца, который гасит егосвечение. В ходе реакции амплификации этот комплекс разрушается, ион марганца образует нерастворимый осадок с ионом пирофосфата, а высвободившийся кальцеин начинает флуоресцировать (рис.1, *б,* см.обложку). Свечение также может усиливаться благодаря объединению кальцеина с ионами Mg2+ из реакционной смеси. Флуоресценция кальцеина хорошо видна в ультрафиолетовом излучении (365 нм), но изменение цвета реакционной смеси заметно невооруженным глазом и при дневном освещении. Благодаря своей простоте и наглядности этот метод детекции используется для детекции различных инфекционных агентов. [9-11]. Также этот метод был использован для детекции по конечной точке в переносном микрокапиллярном устройстве для проведения LAMP, учет результатов в котором можно проводить помощью смартфона [12].

Колориметрическая детекция с гидроксинафтоловым синим. Еще один метод детекции с использованием металлоиндикатора предложил M. Goto и соавт. [13]. В этой работе индикатором выступали молекулы гидроксинафтола синего (ГНС). В ходе реакции цвет смеси менялся с фиолетового на голубой в результате связывания ионов Mg^{2+} с пирофосфатом (рис.1, *в,* см.обложку). Изменение цвета можно было наблюдать невооруженным глазом, в ультрафиолетовом свете и измерять спектрофотометрически при длине волны 650 нм. Аналитиче-

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-67-72

ская чувствительность метода - около $6,4\times10^3$ копий/мл ДНК фага λ, что эквивалентно чувствительности анализа с использованием SYBR Green I, и в 10 раз выше чувствительности метода с использованием кальцеина. По мнению авторов, данное различие вызвано ингибирующим эффектом ионов Mn^{2+}, добавляемых в реакционную смесь с кальцеином. Реакция проводится в закрытой пробирке. Изменение цвета реакционной смеси оценивается визуально, что делает метод удобным для качественной детекции в полевых условиях, но при этом отсутствует возможность провести количественную оценку или мультиплексный анализ. Метод не получил такого широкого применения как турбидиметрия, но также используется при детекции в реакции LAMP различных инфекционных агентов [14-17] и для оценки резистентности микроорганизмов к лекарственным средствам [17]. Существуют варианты с лиофилизированными реакционными смесями, которые могут долго храниться при положительной температуре и использоваться в полевых условиях [14].

Модифицированные наночастицы золота. Золотые наночастицы (AuNP), обладающие уникальными колориметрическими свойствами, хорошо подходят для детекции результатов LAMP. AuNP имеют характерную полосу поглощения поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в области видимого света, точный спектр которого зависит от расстояния между частицами. В частности, агрегация частиц вызывает смещение полосы поглощения SPR в красную сторону и сопутствующее изменение цвета от красного к фиолетовому. Был описан колориметрический способ детекции с использованием наночастиц золота, модифицированных 11-меркаптоундекановой кислотой (MUA-AuNP). Частицы агрегировали в присутствии ионов Mg^{2+}, окрашивая реакционную смесь в фиолетовый цвет. Затем, в процессе реакции амплификации, в присутствии ионов пирофосфата, частицы дезагрегируют и выпадают в виде осадка красного цвета [18] (рис.1, *г,* см.обложку). Чувствительность метода составила 200 копий ДНК-генома фага λ при объеме реакционной смеси в 20 мкл. Для детекции результатов на основе этого метода, другой группой ученых был разработан портативный прибор для «point-of-care» диагностики [19], позволяющий одновременно поддерживать температуру реакции и проводить измерение абсорбции света в реальном времени, отправляя результаты на смартфон или другое мобильное устройство.

Прямые методы детекции. В отличие от косвенных методов детекции результатов LAMP, прямые методы нацелены на обнаружение самих ампликонов, образующихся в результате реакции.

Флуориметрическое выявление ампликонов с применением интеркалирующих красителей. Может проводится как в режиме реального времени (рис.2, *а,*см.обложку), так и путем электрофореза продуктов реакции в агарозном геле, что является классическим подходом к детекции результатов LAMP (рис.2, *б,* см.обложку). Из-за особенностей механизма протекания реакции LAMP, на электрофореграмме выявляется характерная «лестница», по которой можно судить об успешном протекании реакции. Электрофорез надежен и до сих пор используется как референсный метод детекции продуктов LAMP [10, 20]. В то же время этот метод имеет ряд существенных недостатков, таких как высокий риск контаминации ампликонами, относительно большую трудоемкость, необходимость работать с токсичными красителями, невозможность количественной оценки и учета результатов в режиме реального времени.

Интеркалирующие красители могут использоваться как для детекции продуктов LAMP по конечной точке, так и для детекции в режиме реального времени. В качестве примера детекции по конечной точке можно привести работу M. Parida и соавт. [21]. SYBR Green I, использованный в этой работе, дает возможность быстрой детекции, как при дневном свете – при положительной реакции происходит изменение цвета с оранжевого на зеленый; так и для детекции в ультрафиолетовом излучении – в присутствии ампликонов наблюдается зеленое свечение (рис.2, *в, г,* см.обложку). Несмотря на высокий риск контаминации и невозможность количественного анализа, SYBR Green I широко используется в различных LAMP тест-системах [20]. Примерно в это же время появились ряд статей в которых описано использование SYBR Green I для детекции в режиме реального времени [22], но поскольку этот краситель является достаточно сильным ингибитором реакции, были предложены и другие интеркалирующие красители, такие как EvaGreen [23], PicoGreen [24], SYTO-9 [25], берберин [26] и другие.

Согласно проведенному сравнению шести интеркалирующих красителей (SYTO-9, SYTO-13, SYTO-82, SYBR Green I, SYBR Gold и EvaGreen), наилучшими характеристиками для реакции LAMP в режиме реального времени обладают красители SYTO-9 и SYTO-82, т.к. обеспечивают наибольшее отношение сигнал/фон, демонстрируют быстрое появление положительного сигнала и в меньшей степени ингибируют реакцию амплификации [27]. Последнее, вероятнее всего, связано с низкой, относительно других красителей, аффинностью SYTO-9 и SYTO-82 к двухцепочечной ДНК [28].

FRET. В основе этого метода детекции лежит резонансный перенос энергии флуоресценции (fluorescence resonance energy transfer, FRET), который заключается в обмене энергии между двумя фотоактивными молекулами или группами: донором и акцептором (темновой тушитель) энергии. Впервые это метод для детекции LAMP использовали P.H. Chou и соавт. в 2011 г. [29], который синтезировал два специфических зонда, нацеленных на петлевые участки в продуктах амплификации. Акцепторный зонд был помечен LightCycler Red 640 на 5'-конце и фосфорилирован на 3'-конце, чтобы избежать нежелательного удлинения. Когда оба зонда гибридизуются с целевой последовательностью, энергия флуоресценции передается от флуоресцеинового красителя к акцепторному красителю LC640, что приводит к его эмиссии. Детекция проводится в режиме реального времени.

Иммуноферментный анализ. Комбинацию иммуноферментного анализа (ИФА) с LAMP предложил H. Ravan и соавт. [30]. В реакции использовались меченые дигоксигенином нуклеотиды, которые встраивались в ампликоны и 5'-биотинилированные зонды, нацеленные на последовательность внутри ампликона. После проведения реакции ее продукты фиксировались на стенках планшета с иммобилизованным стрептавидином, а неспецифические продуты удалялись с помощью многократных отмывок. Затем проводили инкубацию с меченными пероксидазой антителами к диоксигенину. В усовершенствованном варианте этого метода [31] пара биотинилированных петлевых праймеров заранее

сорбировалась на поверхности микропланшета. Это позволило уменьшить общее время детекции и снизить риск перекрестной контаминации, однако по этим параметрам ИФА-LAMP по-прежнему проигрывает другим методам детекции.

Иммунохроматография. В 2008 г. W. Kiatpathomchai и соавт. [32] предложили новый способ детекции результатов LAMP, основанный на методе иммунохроматографии. В реакции использовались праймеры, меченные FITC и биотином, благодаря которым продуктом амплификации была ДНК с двумя метками. Биотинилированный гибридизированный с FITC продукт LAMP наносился на участок специальной тест-полоски, содержащей красящие вещества - наночастицы коллоидного золота, покрытые антителами к FITC. Комплекс ДНК-наночастица проходит по мембране к линии со стрептавидином и, связываясь с ним, остается на тест полоске, образуя цветную линию. Для положительного контроля реакции используется полоска, содержащая антитела, связывающая непосредственно красящие частицы.

В последующих исследованиях этот метод был модифицирован, для проведения мультиплексной реакции с использованием различных комбинаций репортерных молекул (FITC [33], DIG [34], TEXAS RED [35]). Метод не требует специальной аппаратуры и подходит для диагностики «point-of-care». Аналитическая чувствительность составила от 50 до 5 пкг РНК/мкл, что сопоставимо с чувствительностью ПЦР-РВ и RT-LAMP, электрофоретической детекцией, и в десть раз превышает чувствительность RT-LAMP с использованием кальцеина [32]. К недостаткам можно отнести высокий риск контаминации и невозможность количественного определения. Показана возможность применения метода для детекции ДНК различных инфекционных агентов (бактерий, вирусов, грибов, простейших) [33-35] как в медицине, так и в ветеринарии. в том числе для оценки чистоты продуктов питания [36], контроля за генетически модифицированными культурами [37] и анализа биоматериала в криминалистике [38].

Использование катионных полимеров. Метод был разработан Y. Mori и соавт. [39] и апробирован на плазмидных ДНК с фрагментами геномов вирусов гепатита B и C. В реакционную смесь добавляется два олигонуклеотидных зонда, причем зонд к геному вируса гепатита B - помечен красителем FITC, а гепатита C – ROX. По завершению реакции амплификации в пробирку добавляли раствор низкомолекулярного (Mr = 600) полиэтиленимина (ПЭИ), который, благодаря положительному заряду, образует нерастворимый комплекс с продуктами амплификации LAMP, гибридизированными с мечеными зондами. После краткого центрифугирования, осадок облучали ультрафиолетом (длина волны – 365 нм), получая видимое глазом свечение, окрашенное в соответствии с красителем зонда. Использование различных красителей позволяет проводить детекцию в мультиплексном формате. Необходимость добавлять ПЭИ после завершения реакции может привести к контаминации продуктами амплификации, однако эту проблему можно решить различными механическими приспособлениями, например, использованием восковой пробки, которая плавится под воздействием высоких температур по завершении реакции LAMP.

Данный метод не получил широкого распространения, в дальнейшем его использование упоминается всего в одной статье: T. Khamlor и соавт. [40] использовали его в системе определения пола эмбрионов крупного рогатого скота.

Наночастицы золота могут использоваться не только для непрямого метода детекции, описанного выше, но также и для детекции непосредственно ампликонов. В этом случае наночастицы конъюгируются не с 11-меркаптоундекановой кислотой, а с олигонуклеотидными зондами к целевым последовательностям ДНК. После проведения реакции в раствор добавляется соль $MgSO_4$, которая, в случае отрицательного результата LAMP, индуцирует агрегацию частиц, и, как следствие, изменение цвета раствора с красного на серый или синий. Если реакция положительная, зонды связываются с наработанными ампликонами и агрегации частиц при добавлении соли не происходит – окраска реакционной смеси остается красной [41].

Микрочипы и микрофлюидные системы. Для разработок в области диагностики «point-of-care» имеется выраженная тенденция к миниатюризации, про-

Сравнительная характеристика различных методов детекции LAMP

Метод детекции	Оборудование	Риск контаминации	Возможность количественной оценки	Возможность детекции в режиме реального времени	Возможность мультиплексной реакции
Турбидиметрия	Турбидиметр	Низкий	Да	Да	Нет
Кальцеин	Не обязательно	Низкий	Нет	Нет	Нет
Гидроксинафтоловый синий	Не обязательно	Низкий	Нет	Нет	Нет
Модифицированные наночастицы золота	Не обязательно	Низкий	Нет	Нет	Нет
Электрофорез	Камера для электрофореза	Высокий	Нет	Нет	Нет
Интеркалирующие красители	Флуориметр	Низкий	Да	Да	Нет
LAMP-ИФА	Флуориметр	Высокий	Нет	Нет	Нет
Иммунохроматография	Нет	Высокий	Нет	Нет	Да
ПЭИ	Источник УФ-излучения	Высокий	Нет	Нет	Да
Наночастицы золота	Не обязательно	Высокий	Нет	Нет	Нет
FRET	Флуориметр	Низкий	Да	Да	Нет

DOI: http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-67-72

ведению реакции на микрочипах и микрофлюидных устройствах. *Электрохимические чипы* для детекции продуктов амплификации LAMP использовались в работе N. Nakamura и соавт. [42] для определения однонуклеотидных полиморфизмов. Специально синтезированные зонды с тиольной группой на 3'-концах, иммобилизовались на золотом электроде. На чип наносилась реакционная смесь, затем чип промывался и реагировал с фосфатным буфером с добавлением интеркалирующего красителя ДНК Hoechst 33258. Результат учитывается по анодному пику методом вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала. Реакция гибридизации, промывка, детекция и анализ результатов проводится в автоматическом режиме. В отличие от микрочипов с флуоресцентным анализом, метод не требует сложной маркировки флуорохромами и оборудования для учета результатов флюоресценции, что упрощает использование, пробоподготовку и снижает стоимость анализа. Однако время реакции при этом достигает двух часов. Детекцию на электрохимических микрочипах можно проводить без иммобилизованных на электроде зондов. В таких случаях используется редокс-соединения (например, RuHex) и GspSSD ДНК-полимераза, т.к. она обладает толерантностью к высокой концентрации интеркалирующих окислительно-восстановительных соединений, высокая концентрация которых может привести к ингибированию активности Bst ДНК-полимеразы. По мнению K. Hashimoto и соавт. [43] сигнал может усиливаться путем взаимодействия RuHex с пирофосфатом. Измерение проводится по катодному пику.

Существует большое количество разработок микрочипов с оптической детекцией, как на основе вышеописанных косвенных методах детекции (кальцеин [44], HNB [45]), так и прямых, с добавлением интрекалирующих красителей (SYBR Green I [46, 47], SYTO-82 [48], SYTO-9 [49] и т.д.) и электрофорезом [50]. Ряд публикаций описывает системы с возможностью детекции результатов через смартфоны и другие мобильные устройства, что несомненно является огромным преимуществом для диагностики в полевых условиях. При этом смартфоны со специальными приложениями могут выступать как устройства для анализа результата, переданного по Bluetooth [51], так и как считывающее устройство, заменяющее собой флуоресцентные детекторы [52].

Заключение. За 20 лет с момента появления петлевой изотермической амплификации было разработано множество подходов к детекции результатов LAMP. Самыми перспективными для «point-of-care» диагностики инфекционных заболеваний являются методы турбидиметрии и использование интеркалирующих красителей. Оба этих метода являются реакциями с закрытым контуром (т.е. не требуют открытия пробирок после завершения реакции), а значит сопряжены с низким риском контаминации, они универсальны, подходят для детекции в реальном времени и количественной оценки результата, не требуют дорогого оборудования и могут осуществляться быстро в портативных приборах (см. таблицу). Разработаны также приборы для детекции результатов LAMP методами турбидиметрии и флуориметрии (Loopamp Realtime Turbidimeter (LA-500), Eiken Chemical, Япония и Genie® II, «OptiGene Limited», Великобритания). Разработка подобных отечественных приборов является актуальной задачей, решение которой будет способствовать широкому внедрению метода LAMP в практику клинической лабораторной диагностики.

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kumar S., Kumar A., Venkatesan G. Isothermal Nucleic Acid Amplification System: An Update on Methods and Applications. *Journal of Genetics and Genomes*. 2018;2(1):Isothermal amplifcation; Advantages; Disadvantages; Applications.
2. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):E63.
3. Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2001; 289(1):150-4.
4. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2004;59(2): 145-57.
5. Yuan X., Bai C., Cui Q., Zhang H., Yuan J., Niu K., et al. Rapid detection of Mycoplasma pneumoniae by loop-mediated isothermal amplification assay. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(25):e10806.
6. Kumar J.S., Saxena D., Parida M., Rathinam S.. Evaluation of real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for clinical diagnosis of West Nile virus in patients. *Indian J. Med. Res*. 2018;147(3):293-8.
7. Aydin-Schmidt B., Xu W., Gonzalez I.J., Polley S.D., Bell D., Shakely D., et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low density parasitaemias. *PLoS One*. 2014;9(8):e103905.
8. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc*. 2008;3(5):877-82.
9. Zhao J., Feng R. Sensitive and rapid detection of Zika virus by loop-mediated isothermal amplification. *Virus Genes*. 2018.
10. Besuschio S.A., Llano Murcia M., Benatar A.F., Monnerat S., Cruz I., Picado A., et al. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of Trypanosoma cruzi DNA in human blood samples. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2017;11(7): e0005779.
11. Zhang Q., Shavalier M., Standish I., Glenney G.W., Loch T.P., Faisal M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection and quantification of epizootic epitheliotropic disease virus (salmonid herpesvirus-3). *J. Virol. Methods*. 2019;264: 44-50.
12. Hui J., Gu Y., Zhu Y., Chen Y., Guo S.J., Tao S.C., et al. Multiplex sample-to-answer detection of bacteria using a pipette-actuated capillary array comb with integrated DNA extraction, isothermal amplification, and smartphone detection. *Lab. Chip*. 2018;18(18):2854-64.
13. Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*. 2009; 46(3): 167-72.
14. Chen H.W., Weissenberger G., Ching W.M. Development of Lyophilized Loop-Mediated Isothermal Amplification Reagents for the Detection of Leptospira. *Mil. Med*. 2016;181(5 Suppl): 227-31.
15. Choopara I., Arunrut N., Kiatpathomchai W., Dean D., Somboonna N. Rapid and visual Chlamydia trachomatis detection using loop-mediated isothermal amplification and hydroxynaphthol blue. *Lett. Appl. Microbiol*. 2017;64(1): 51-6.
16. Meena P.N., Kharbikar L.L., Rana R.S., Satpathy S., Shanware A., Sivalingam P.N., et al. Detection of Mesta yellow vein mosaic virus (MeYVMV) in field samples by a loop-mediated isothermal amplification reaction. *J. Virol. Methods*. 2019;263: 81-7.
17. Chahar M., Anvikar A., Dixit R., Valecha N.. Evaluation of four novel isothermal amplification assays towards simple and rapid genotyping of chloroquine resistant Plasmodium falciparum. *Exp. Parasitol*. 2018;190:1-9.

18. Wong J.K., Yip S.P., Lee T.M. Ultrasensitive and closed-tube colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay using carboxyl-modified gold nanoparticles. *Small*. 2014;10(8):1495-9.
19. Qin A., Fu L.T., Wong J.K., Chau L.Y., Yip S.P., Lee T.M. Precipitation of PEG/Carboxyl-Modified Gold Nanoparticles with Magnesium Pyrophosphate: A New Platform for Real-Time Monitoring of Loop-Mediated Isothermal Amplification. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2017;9(12):10472-80.
20. Huang Q., Li Z., Ma Z., Li H., Mao R. Specific and rapid identification of the Pheretima aspergillum by loop-mediated isothermal amplification. *Biosci. Rep*. 2019; 39(2).
21. Parida M., Horioke K., Ishida H., Dash P.K., Saxena P., Jana A.M., et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Clin. Microbiol*. 2005;43(6): 2895-903.
22. Maeda H., Kokeguchi S., Fujimoto C., Tanimoto I., Yoshizumi W., Nishimura F., et al. Detection of periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis by loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2005;43(2):233-9.
23. Mair G., Vilei E.M., Wade A., Frey J., Unger H. Isothermal loop-mediated amplification (LAMP) for diagnosis of contagious bovine pleuro-pneumonia. *BMC Vet. Res*. 2013;9:108.
24. Qin C., Jian L., Xue-En F., Wei X.. Rapid detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Intervirology*. 2009;52(2): 86-91.
25. Patel J.C., Oberstaller J., Xayavong M., Narayanan J., DeBarry J.D., Srinivasamoorthy G., et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the species-specific identification of Plasmodium vivax. *PLoS One*. 2013;8(1): e54986.
26. Fischbach J., Xander N.C., Frohme M., Glokler J.F. Shining a light on LAMP assays--a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques*. 2015;58(4): 189-94.
27. Oscorbin I.P., Belousova E.A., Zakabunin A.I., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques*. 2016; 61(1): 20-5.
28. Gudnason H., Dufva M., Bang D.D., Wolff A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(19): e127.
29. Chou P.H., Lin Y.C., Teng P.H., Chen C.L., Lee P.Y. Real-time target-specific detection of loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus using fluorescence energy transfer-based probes. *J. Virol. Methods*. 2011;173(1): 67-74.
30. Ravan H., Yazdanparast R. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method in conjunction with an enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Salmonella serogroup D. *Anal. Chim. Acta*. 2012;733: 64-70.
31. Ravan H., Yazdanparast R. Loop region-specific oligonucleotide probes for loop-mediated isothermal amplification-enzyme-linked immunosorbent assay truly minimize the instrument needed for detection process. *Anal. Biochem*. 2013;439(2):102-8.
32. Kiatpathomchai W., Jaroenram W., Arunrut N., Jitrapakdee S., Flegel T.W. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J. Virol. Methods*. 2008;153(2): 214-7.
33. Deng J., Pei J., Gou H., Ye Z., Liu C., Chen J. Rapid and simple detection of Japanese encephalitis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J. Virol. Methods*. 2015;213: 98-105.
34. Tomlinson J.A., Dickinson M.J., Boonham N. Rapid detection of Phytophthora ramorum and P. kernoviae by two-minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device. *Phytopathology*. 2010;100(2): 143-9.
35. Foo P.C., Chan Y.Y., Mohamed M., Wong W.K., Nurul Najian A.B., Lim B.H. Development of a thermostabilised triplex LAMP assay with dry-reagent four target lateral flow dipstick for detection of Entamoeba histolytica and non-pathogenic Entamoeba spp. *Anal. Chim. Acta*. 2017;966:71-80.
36. Lalle M., Possenti A., Dubey J.P., Pozio E. Loop-Mediated Isothermal Amplification-Lateral-Flow Dipstick (LAMP-LFD) to detect Toxoplasma gondii oocyst in ready-to-eat salad. *Food Microbiol*. 2018;70:137-42.
37. Takabatake R., Kagiya Y., Minegishi Y., Futo S., Soga K., Nakamura K., et al. Rapid Screening Detection of Genetically Modified Crops by Loop-Mediated Isothermal Amplification with a Lateral Flow Dipstick. *J. Agric. Food Chem*. 2018;66(29):7839-45.
38. Kanchanaphum P. Time Course of Detection of Human Male DNA from Stained Blood Sample on Various Surfaces by Loop Mediated Isothermal Amplification and Polymerase Chain Reaction. *Biomed. Res. Int*. 2018;2018:2981862.
39. Mori Y., Hirano T., Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnol*. 2006;6:3.
40. Khamlor T., Pongpiachan P., Parnpai R., Punyawai K., Sangsritavong S, Chokesajjawatee N. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*. 2015;83(5):891-6.
41. Seetang-Nun Y., Jaroenram W., Sriurairatana S., Suebsing R., Kiatpathomchai W. Visual detection of white spot syndrome virus using DNA-functionalized gold nanoparticles as probes combined with loop-mediated isothermal amplification. *Mol. Cell Probes*. 2013;27(2):71-9.
42. Nakamura N., Ito K., Takahashi M., Hashimoto K., Kawamoto M., Yamanaka M., et al. Detection of Six Single-Nucleotide Polymorphisms Associated with Rheumatoid Arthritis by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method and an Electrochemical DNA Chip. *Analytical Chemistry*. 2007;79: 9484-93.
43. Hashimoto K., Inada M., Ito K. A novel voltammetric approach for real-time electrochemical detection of targeted nucleic acid sequences using LAMP. *Anal. Biochem*. 2017;539:113-7.
44. Fang X., Chen H., Xu L., Jiang X., Wu W., Kong J. A portable and integrated nucleic acid amplification microfluidic chip for identifying bacteria. *Lab. Chip*. 2012;12(8):1495-9.
45. Safavieh M., Ahmed M.U., Sokullu E., Ng A., Braescu L., Zourob M. A simple cassette as point-of-care diagnostic device for naked-eye colorimetric bacteria detection. *Analyst*. 2014;139(2): 482-7.
46. Connelly J.T., Rolland J.P., Whitesides G.M. «Paper Machine» for Molecular Diagnostics. *Anal. Chem*. 2015;87(15):7595-601.
47. Lam L., Sakakihara S., Ishizuka K., Takeuchi S., Arata H.F., Fujita H., et al. Loop-mediated isothermal amplification of a single DNA molecule in polyacrylamide gel-based microchamber. *Biomed. Microdevices*. 2008;10(4): 539-46.
48. Ahmad F., Seyrig G., Tourlousse D.M., Stedtfeld R.D., Tiedje J.M., Hashsham S.A. A CCD-based fluorescence imaging system for real-time loop-mediated isothermal amplification-based rapid and sensitive detection of waterborne pathogens on microchips. *Biomed. Microdevices*. 2011;13(5): 929-37.
49. Liu C., Mauk M.G., Hart R., Bonizzoni M., Yan G., Bau H.H. A low-cost microfluidic chip for rapid genotyping of malaria-transmitting mosquitoes. *PLoS One*. 2012;7(8): e42222.
50. Hataoka Y., Zhang L., Mori Y., Tomita N., Notomi T., Baba Y. Analysis of specific gene by integration of isothermal amplification and electrophoresis on poly(methyl methacrylate) microchips. *Anal. Chem*. 2004;76(13): 3689-93.
51. Wang H., Ma Z., Qin J., Shen Z., Liu Q., Chen X. et al. A versatile loop-mediated isothermal amplification microchip platform for Streptococcus pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae testing at the point of care. *Biosens. Bioelectron*. 2019;126:373-80.
52. Loo J.F., But G.W., Kwok H.C., Lau P.M., Kong S.K., Ho H.P. et al. A rapid sample-to-answer analytical detection of genetically modified papaya using loop-mediated isothermal amplification assay on lab-on-a-disc for field use. *Food Chem*. 2019;274:822-30.

Поступила 03.12.19
Принята к печати 09.12.19

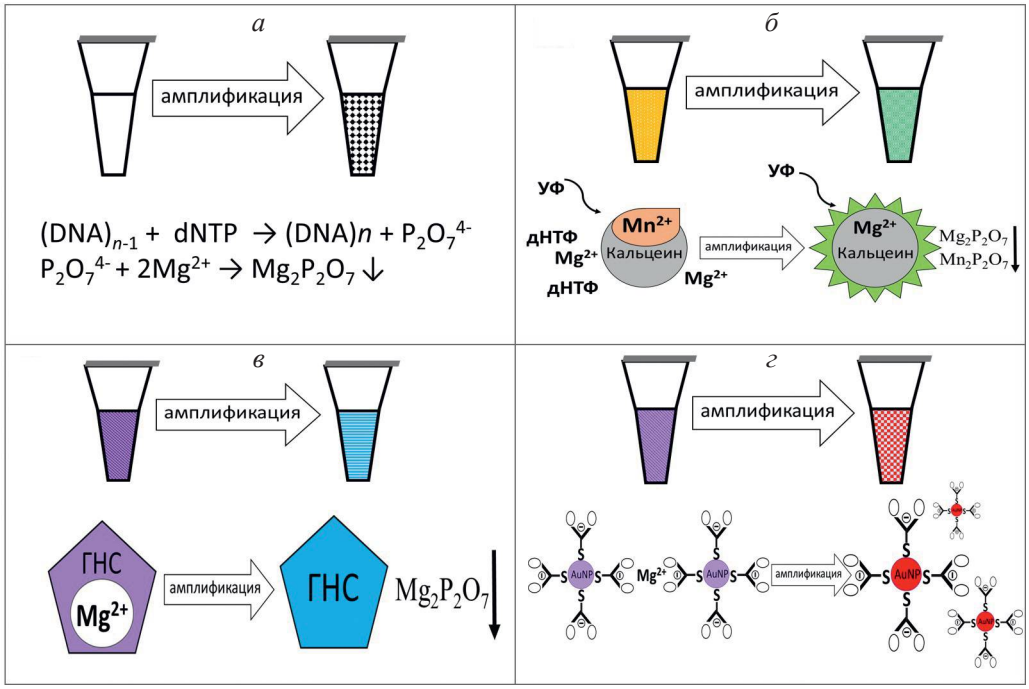


Рис. 1. Колориметрические методы детекции результатов LAMP. *а* - турбидиметрический метод: высвободившийся в ходе полимеризации ДНК ион пирофосфата реагирует с Mg^{2+}, образуя нерастворимый осадок. Повышение мутности раствора свидетельствует о положительном результате; *б* - флуоресцентная детекция с кальцеином: в ходе реакции амплификации разрушается комплекс Mn^{2+} - кальцеин, высвободившийся кальцеин начинает флуоресцировать; *в* - детекция с гидроксинафтоловым синим (ГНС): ГНС меняет цвет с фиолетового на голубой в результате связывания Mg^{2+} с пирофосфатом; *г* - модифицированные наночастицы золота (AuNP): в результате взаимодействия Mg^{2+} с пирофосфатом происходит диссоциация наночастиц и изменение цвета раствора с фиолетового на красный.

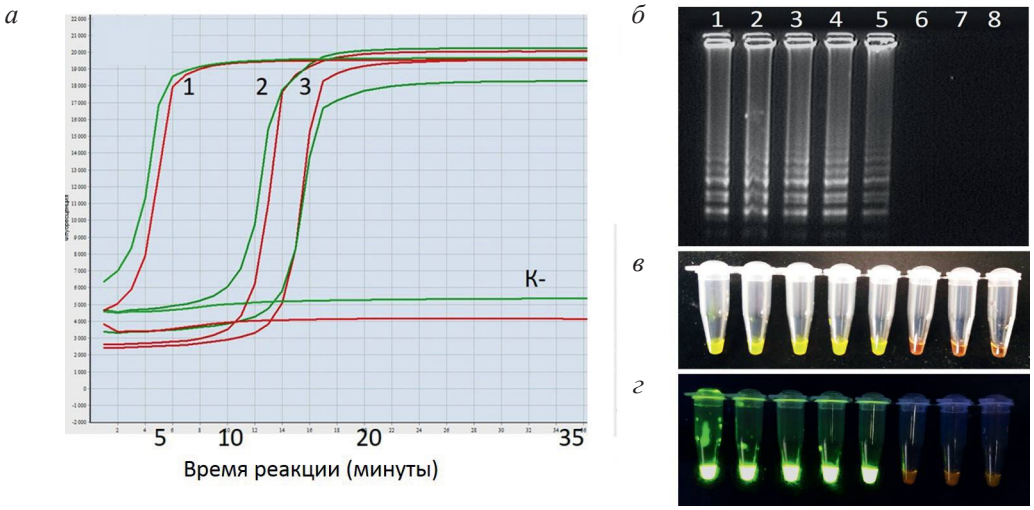


Рис. 2. Использование интеркалирующих красителей для детекции результатов реакции LAMP. *а* - SYTO-9 для детекции результатов реакции LAMP в режиме реального времени; кривые 1 - 3 – образцы, содержащие ДНК, К- – отрицательный контроль; *б* - бромистый этидий для электрофоретической детекции в агарозном геле; 1 - 5 образцы содержащие ДНК, 6 - 7 - образцы не содержащие ДНК, 8 – отрицательный контроль; *в, г* - SYBR-Green I для визуальной детекции ампликонов при дневном освещении и в ультрафиолетовом свете, соответственно.