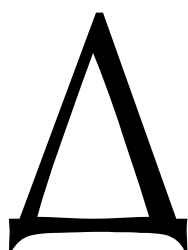


ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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



КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 66

7 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

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

ИЮЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

ОАО «Издательство "Медицина"»
115088, Москва, Новоостоповская 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 10.07.2021.
Подписано в печать 25.07.2021. Формат
60 × 88½.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru
WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого из-
дания не может быть занесена в память компью-
тера либо воспроизведена любым способом
без предварительного письменного разреше-
ния издателя.

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

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.aks.ru,
www.pressa-rt.ru
Подписка на электронную версию:
elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2021. № 7. 385-448.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИ-
ХИНА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАН-
ЛЫ, В.Т. МОРОЗОВА, Л.М. СКУИНЬ, А.А. ТОТОЛЯН,
Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответственный секретарь), И.П. ШАБА-
ЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (Ташкент), Т.В. БАВИЛОВА (Санкт-
Петербург), I. WATSON (Великобритания, Ливерпуль),
А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (Уфа), Д.А. ГРИЩЕНКО (Красноярск),
В.С. ГУДУМАК (Кишинёв), Н.Г. ДАШКОВА (Москва),
В.А. ДЕЕВ (Киев), Т.И. ДОЛГИХ (Омск), С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА
(Барнаул), А.В. ИНДУТНЫЙ (Омск), А. KALLNER (Швеция,
Стокгольм), А.И. КАРПИЩЕНКО (Санкт-Петербург),
К.П. КАШКИН (Москва), 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"»

OA O IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 66
7 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JULY

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:
8-495-430-03-63,
E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru
WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

The Journal is presented in data base of the
Russian index of scientific quotation (RiNZ) and
in following I&R editions: Abstracts of Microbiology,
Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical
Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost
Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EM-
BASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica,
Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental
Literature, National Library of Medicine PubMed,
OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions
Weekly (Print), Thomson Reuters Biological Ab-
stracts (Online), Thomson Reuters BIOSIS Pre-
views, 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. ZUBRIKHINA,
A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, S.G. MARDAN-
LY, V.T. MOROZOVA, L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN,
G.G. KHARSEEVA (executive editor), 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*), 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. MAVZYTTOV (*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. TARTAKOVSKIY (*Moscow*),
A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peter-
burg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV
(*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA
(*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Вольхина И.В., Бутолин Е.Г., Данилова Л.А.
Перспективы использования показателей обмена сиаловых кислот в медицине (обзор литературы). 389
- Попова И.Г., Ситникова О.Г., Назаров С.Б., Садов Р.И., Панова И.А., Баев Т.О., Кузьменко Г.Н.,
Харламова Н.В., Клычева М.М., Веселкова Ю.Н.
Содержание сероводорода у женщин с умеренной и тяжелой преэклампсией в III триместре
беременности и их новорожденных 396
- Добровольская М.М., Зубрихина Г.Н., Блиндарь В.Н., Сытов А.В.
Окислительный стресс и эндогенная интоксикация у онкологических больных 401
- Янушевич О.О., Духовская Н.Е., Вавилова Т.П., Островский Ю.А.,
Курбанова З.Т., Островская Ю.А.
Слюна как новый аналитический объект для определения уровня D-димера 407

КОАГУЛОЛОГИЯ

- Арипов А.Н., Каюмов У.К., Иноятова Ф.Х., Хидоятова М.Р.
Роль лёгких в системе гемостаза (обзор литературы). 411

ЦИТОЛОГИЯ

- Душкин А.Д., Афанасьев М.С., Затевалов А.М., Алёшкин В.А., Миронов А.Ю., Афанасьев С.С.,
Несвижский Ю.В., Борисова О.Ю., Гришачёва Т.Г., Караулов А.В.
Цифровой анализ и количественная оценка изменений поверхности шейки матки при дисплазии 417

ИММУНОЛОГИЯ

- Давидович Н.В., Соловьёва Н.В., Галиева А.С., Лепёшкин С.Ю., Башилова Е.Н., Писарева С.Н., Бажукова Т.А.
Роль системы антимикробных пептидов в неспецифической защите полости
рта при воспалительных заболеваниях пародонта 422

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Шепелин А.П., Полосенко О.В., Требунских И.П.,
Сидорова Н.А., Борисова А.Б., Миронов А.Ю., Афанасьев С.С.
Возможности практического применения разных питательных сред для первичного посева
при лабораторной диагностике дифтерии 428
- Детушева Е.В., Еришова О.Н., Фурсова Н.К.
Исследование антибактериальной активности дезсредств и антисептиков различных классов против бактериальных
возбудителей внутрибольничных инфекций 438

РЕЦЕНЗИЯ

- Рецензия на монографию Марданлы С.Г., Симоновой Е.Г., Симонова В.В.
Герпесвирусные инфекции: этиология и патогенез, клиника и лабораторная диагностика, эпидемиология
и профилактика. Орехово-Зуево: Государственный гуманитарно-технологический университет; 2020 448

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Volkhina I.V., Butolin E.G., Danilova L.A.*
Prospects for the use of indicators of sialic acid metabolism in medicine review of literature) 389
- Popova I.G., Sitnikova O.G., Nazarov S.B., Sadov R.I., Panova I.A., Baev T.O., Kuzmenko G.N.,
Kharlamova N.V., Klycheva M.M., Veselkova YU.N.*
Hydrogen sulfide content in pregnant women with preeclampsia in late gestation and their newborns 396
- Dobrovolskaya M.M., Zubrikhina G.N., Blindar V.N., Sytov A.V.*
Oxidative stress and endogenous intoxication in cancer patients 401
- Yanushevish O.O., Dukhovskaya H.E., Vavilova T.P., Ostrovskiy Y.A.,
Kurbanova Z.T., Ostrovskaya Yu.A.*
Saliva as new analytical object for D-dimer level determination 407

COAGULOLOGY

- Aripov A.N., Kayumov U.K., Inoyatova F.Kh., Khidoyatova M.R.*
Role of lungs in the hemostasis system (review of literature) 411

CYTOLOGY

- Dushkin A. D., Afanasiev M. S., Zatevalov A. M., Aleshkin V. A., Mironov A. Yu., Afanasiev S. S.,
Nesvizhsky Yu. V., Borisova O. Y., Grishacheva T. G., Karaulov A. V.*
Digital analysis and quantitative assessment of the cervical surface with dysplasia 417

IMMUNOLOGY

- Davidovich N.V., Solovieva N.V., Galieva A.S., Lepeshkin S.Yu., Bashilova E.N.,
Pisareva S.N., Bazhukova T.A.*
Role of antimicrobial peptides system in inflammatory periodontal diseases non-specific oral cavity protection 422

MICROBIOLOGY

- Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Shepelin A.P., Polosenko O.V., Trebunskich I.P., Sidorova N.A.,
Borisova A. B., Mironov A.Yu., Afanasiev S.S.* Possibilities of practical application of different culture mediums for laboratory
diagnostic of diphtheria 428
- Detusheva E.V., Ershova O.N., Fursova N.K.*
The study of the antibacterial activity of disinfectants and antiseptics of various classes against bacterial
pathogens of nosocomial infections 438

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Вольхина И.В.¹, Бутолин Е.Г.², Данилова Л.А.¹

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБМЕНА СИАЛОВЫХ КИСЛОТ В МЕДИЦИНЕ

(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, 194100, г. Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, 426034, г. Ижевск, Россия

Сиаловые кислоты (СК) определяют степень гидрофильности содержащих их молекул, облегчают связывание и транспорт ионов, повышают вязкость муцинов, стабилизируют структуры белков и мембран. Сialogликопротеины различаются между собой по строению, в том числе, углеводных цепей, свойствам, месту локализации и биологической роли в организме. К ним относятся разнообразные растворимые секретируемые белки, муцины и протеины мембран. Также СК являются структурными компонентами ганглиозидов, которые участвуют в образовании внешнего слоя плазматических мембран. Степень сialiлирования гликопротеинов и гликолипидов является важным фактором молекулярного узнавания в клетке, между клетками, между клеткой и внеклеточным матриксом, а также между клеткой и некоторыми внешними патогенными факторами. Они могут либо маскировать сайты распознавания, либо служить детерминантами распознавания. К наиболее изученным ферментам обмена СК и сиалодержащих соединений относятся N-ацетилнейраминат цитидилтрансфераза, сialiлтрансферазы, сialiдаза, альдолаза СК и сialiл-O-ацетилэстераза. Многочисленные исследования показали, что aberrантное сialiрование является отличительной чертой различных изменений и нарушений метаболизма. Также сиаловые кислоты являются одной из первых точек контакта между многими различными патогенными микроорганизмами и организмом хозяина благодаря их присутствию на наружных поверхностях клеток и тканей слизистой оболочки. Поэтому изучение содержания различных фракций сиаловых кислот и активности ферментов, участвующих в их обмене, в плазме крови и в тканях, а также влияние на активность этих ферментов с помощью лекарственных препаратов, может внести существенный вклад в диагностику и своевременное лечение многих заболеваний.

Поиск литературы осуществлялся по базам данных Scopus, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library, EMBASE, Global Health, CyberLeninka, РИНЦ и другим.

Ключевые слова: обзор; сиаловые кислоты; сialogликопротеины; сialiлтрансфераза; сialiдаза; диагностика; сialiдозы; обзор.

Для цитирования: Вольхина И.В., Бутолин Е.Г., Данилова Л.А. Перспективы использования показателей обмена сиаловых кислот в медицине (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (7): 389-395.

DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-389-395>

Volkhina I.V.¹, Butolin E.G.², Danilova L.A.¹

PROSPECTS FOR THE USE OF INDICATORS OF SIALIC ACID METABOLISM IN MEDICINE (REVIEW OF LITERATURE)

¹ Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, 194100, Saint-Petersburg, Russia;

² Izhevsk State Medical Academy, 426034, Izhevsk, Russia

Sialic acids (SA) determine the degree of molecular hydrophilia, relieve binding together and their transportation, they increase mucin viscosity, stabilize the protein and membrane structure. Apart from that, SA are structural components of gangliosides participating in the formation of the outer layer of the plasma membrane. The degree of silylation of glycoproteins and glycolipids is an important factor of molecular recognition in the cell, between the cells, between a cell and territorial matrix, as well as between a cell and some outer pathogenic factors. They can either mask the sites of recognition or be determinants of recognition. The most well-studied enzymes taking part in the SA metabolism and sialo-containing compounds are N-acetylneuraminase, cythidyltransferase, sialyltransferase, sialidase, aldolase SA and sialyl-O-acetylsterase. Numerous investigations have shown that aberrant sialylation is a specific feature of various changes and disorders of metabolism. Besides that, sialic acids are the first point of contact for different pathogenic microorganisms and the host's body due to their presence on the external surface of the cells and tissue of the mucous membrane. That is why the study of the above-mentioned various sialic acids fractions as well as of the activity of the enzymes participating in their metabolism in the blood plasma and tissues, and of the influence on the activity of these enzymes with the help of medicine can make an essential contribution to the diagnosis and treatment of many diseases.

Key words: sialic acids; sialoglycoproteins; gangliosides; sialyltransferase; sialidase; diagnostics; sialidosis; review.

For citation: Volkhina I.V., Butolin E.G., Danilova L.A. Prospects for the use of indicators of sialic acid metabolism in medicine (review of literature). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2021; 66 (7): 389-395 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-389-395>

For correspondence: Volkhina I.V., PhD, Associate Professor of Biological Chemistry; e-mail: volchinaiv@gmail.com

Information about authors:

Volkhina I.V., <https://orcid.org/0000-0001-6481-3383>;

Butolin E.G., <https://orcid.org/0000-0002-3312-4689>;

Danilova L.A. <https://orcid.org/0000-0003-0665-1755>.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interests. The author declare no conflict of interest.

Received 12.02.2021
Accepted 12.03.2021

Гликозилирование различных молекул живого организма является наиболее распространенным типом их модификации. Процессы гликозилирования имеют большое значение для поддержания структуры, свойств и биологической активности содержащих в своем составе углеводные остатки веществ. Нарушения процессов гликозилирования приводят к синтезу гликопротеинов или гликолипидов с измененной функцией. Также гликозилирование необходимо для формирования и обеспечения гетерогенности белков [1 – 3].

Простые и сложные углеводы сами по себе или в составе более сложных соединений выполняют важнейшие функции межклеточного взаимодействия, сигнализации, стабилизации и защиты белков от преждевременного протеолиза, а также связывания и нейтрализации вирусов и бактерий. Кроме того, маркированные гликанами молекулы биологических жидкостей, например, многие гликопротеины кровотока, различные секретирующиеся молекулы, подвижные клетки в сосудах крови, узнаются по их углеводным детерминантам многочисленными типами лектинов [1, 4].

Одними из важнейших терминальных моносахаридных остатков гликановых цепей различных низко- и высокомолекулярных соединений являются сиаловые кислоты.

Целью данного обзора является описание современных представлений о значении сиаловых кислот и ферментов их обмена в организме, и перспективе их использования в медицинской практике.

Строение и роль сиаловых кислот. Сиаловые кислоты (СК) являются N- и O-замещенными производными нейраминовой кислоты, к самым важным представителям которых относятся N-ацетилнейраминовые кислоты (N-АНейК, NANA, Neu5Ac) (рис. 1) [5, 6].

СК обладают достаточно высокой реакционной способностью, что обусловлено содержанием различ-

ных функциональных групп в составе этих молекул. Наличие свободной карбоксильной группы позволяет отнести их к числу органических кислот. Отрицательный заряд СК определяет степень гидрофильности молекул, облегчает связывание и транспорт ионов, повышает вязкость муцинов, стабилизирует структуры белков и мембран [7]. Таким образом, наличие и количество этих моносахаридных остатков определяет структуру, физико-химические свойства и выполняемые функции сиалосодержащих соединений.

Сиаловые кислоты занимают терминальное положение в олиго- и полисахаридных цепях гликопротеинов и гликолипидов (ганглиозидов).

Сиалогликопротеины в значительной мере различаются между собой по строению, в том числе углеводных цепей, свойствам, месту локализации и биологической роли в организме. К ним относятся разнообразные растворимые секретируемые белки, муцины и протеины мембран.

Большинство растворимых секретируемых белков (церулоплазмин, трансферрин, эритропоэтин, гаптоглобин, фетуин, орозомукоид и др.) содержат остатки сиаловых кислот в составе гликановых цепей.

Муцины являются крупными высокогликозилированными гликопротеинами, находящимися на поверхности эпителиальных клеток барьерных органов. Их молекулярный вес составляет 5×10^5 – 3×10^7 Да, из которых 50–80% массы принадлежит углеводным цепям [8].

Кислые муцины содержат в своем составе остатки сиаловых кислот или сульфатные группы. Одни муцины секретируются эпителиальными клетками и участвуют в образовании слоя слизи на поверхности эпителиальной выстилки органа, другие имеют трансмембранный домен и входят в состав гликокаликса. Муцины создают защитный барьер, опосредуют взаимодействие эпителиальных клеток с окружающей средой, участвуют в передаче клеточных сигналов, оказывая влияние на процессы пролиферации и иммунологические реакции [9, 10].

Сиалогликоконъюгаты в большом количестве присутствуют на поверхности клеток, образуя плотную сетку сиалированных гликанов, и играют решающую роль в процессах клеточной коммуникации. Внутренние поверхности лизосомальных и эндосомальных мембран также сиалированы [11].

Также СК являются структурными компонентами ганглиозидов, которые относятся к гликосфинголипидам. Эти липиды участвуют в образовании внешнего слоя плазматических мембран. Ганглиозиды с разным

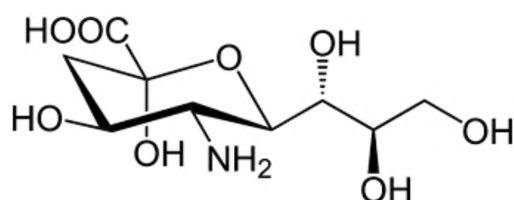


Рис. 1. Нейраминовая кислота.

количеством сиаловых кислот отличаются по функциональным характеристикам [12 – 15].

Степень сиалилирования гликопротеинов и гликолипидов является важным фактором молекулярного узнавания в клетке, между клетками, между клеткой и внеклеточным матриксом, а также между клеткой и некоторыми внешними патогенными факторами [16]. Они могут либо маскировать сайты распознавания, либо служить детерминантами распознавания.

Остатки сиаловых кислот определяют время циркуляции в крови различных гликопротеинов. В многочисленных исследованиях было установлено, что на поверхности паренхиматозных клеток печени имеется гликопротеин, получивший название «связывающий белок печени» или сокращенно «HBP, Hepatic Binding Protein», который узнает и удаляет асиалогликопротеины с концевой галактозой [1].

Обработка эритроцитов животных сиалидазой приводит к их разрушению в течение нескольких часов. У человека в этих условиях время жизни эритроцитов уменьшается со 120 дней до 2 часов. Некоторые исследователи считают, что повышенное содержание глюкозы в крови является важным фактором, обу-

славливающим увеличение количества СК в мембранах эритроцитов, и, таким образом, продлевающим время жизни красных кровяных клеток в кровотоке животных с сахарным диабетом [17].

Благодаря разнообразию СК по структуре, типу гликозидных связей и строению содержащих эти моносахаридные остатки гликановых цепей, а также терминальному расположению СК, не удивительно, что данные углеводы играют многочисленную роль в процессах иммунитета [18].

Ферменты обмена сиаловых кислот. К наиболее изученным ферментам обмена СК и сиалосодержащих соединений относятся N-ацетилнейраминат цитидилтрансфераза (CMP-Neu5Ac-синтаза), некоторые сиалилтрансферазы, сиалидаза, альдолаза СК и сиалил-O-ацетилэстераза.

In vivo СК синтезируется в цитозоле из N-ацетилманнозамина (ManNAc) или N-ацетил-глюкозамина (GlcNAc) по сложному метаболическому пути [6].

ЦМФ-сиаловая кислота (CMP-Neu5Ac) – единственный нуклеозидмонофосфатсахар, выполняющий в животной клетке функцию донора сиаловых кислот [1] и образующийся в ядре в присутствии фермента N-ацетилнейраминат цитидилтрансферазы (EC 2.7.7.43) [19, 20]:

CTP + N-ацетилнейраминат $\rightleftharpoons$ CMP-N-ацетилнейраминат + PPi (рис. 2).

Затем ЦМФ-сиаловая кислота транспортируется в аппарат Гольджи и служит субстратом для переноса остатка сиаловой кислоты на гликоконъюгат с помощью различных сиалилтрансфераз. Вмешательство в процесс активации отменяет дальнейшее сиалилирование, что приводит к гибели эмбрионов у млекопитающих [20].

Сиалилтрансферазы (ST) (EC 2.4.99.X) катализируют реакцию переноса сиаловой кислоты от субстрата-донора цитидин-5'-монофосфат-СК (CMP-Neu5Ac) на субстрат-акцептор – терминальный остаток галактозы (Gal), лактозы (Lac), N-ацетилгалактозамина (GalNAc) или же другой остаток СК. В настоящее время эти ферменты были обнаружены у бактерий, вирусов, в клетках различных органов млекопитающих [5]. Сиалилтрансферазы млекопитающих локализованы в аппарате Гольджи и представляют собой мембранные белки с трансмембранным доменом из 16-20 остатков [21, 22].

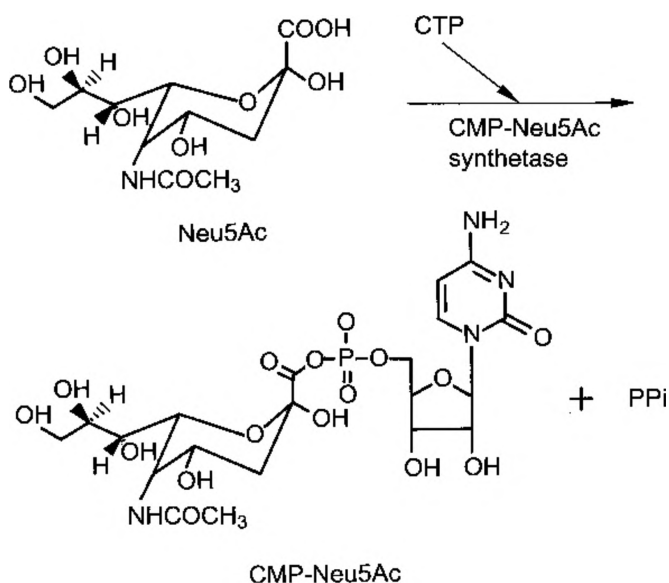


Рис. 2. Образование CMP-Neu5Ac.

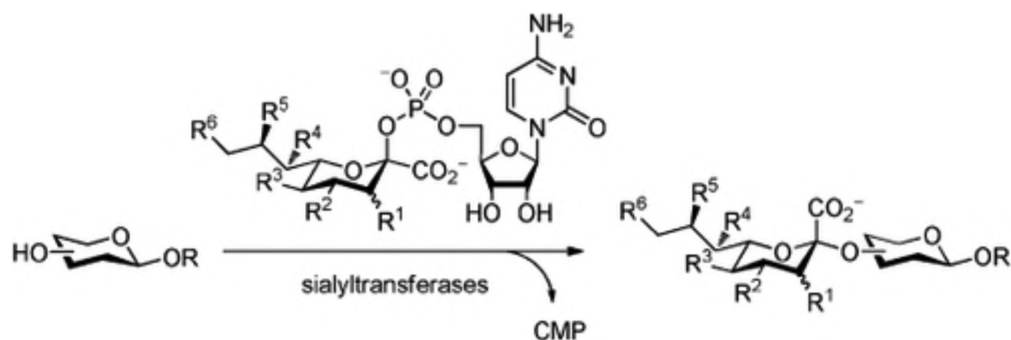


Рис. 3. Реакция переноса от CMP-Neu5Ac на субстрат-акцептор [48].

У человека 20 сиалилтрансфераз и полисиалилтрансфераз были классифицированы на четыре группы в зависимости от типа образующейся связи и природы акцептора углевода. К ним относятся шесть β -галактозид- α 2-3-сиалилтрансфераз (ST3Gal I-VI), две β -галактозид- α 2-6-сиалилтрансферазы (ST6Gal I-II), шесть GalNAc- α 2-6-сиалилтрансфераз (ST6GalNAc I-VI), и шесть α 2-8-сиалилтрансфераз (ST8Sia-I-VI, среди которых ST8Sia-II и ST8Sia-IV являются полисиалилтрансферазами).

Например, β -галактозид- α 2-6-сиалилтрансфераза (КФ 2.4.99.1) катализирует присоединение N-АнейК к концевому невосстанавливающему β -D-галактозилному остатку олигосахаридного фрагмента гликопротеинов и гликолипидов:

СМР-*N*-ацетил- β -нейраминат + β -D-галактозил-R $\rightarrow$ СМР + *N*-ацетил- α -нейраминил-(2 $\rightarrow$ 6)- β -D-галактозил-R.

β -D-галактозил-(1 $\rightarrow$ 3)-*N*-ацетил- β -D-галактозаминид- α 2-3-сиалилтрансфераза (ЕС 2.4.99.2) участвует в образовании ганглиозидов.

К группе сиалилтрансфераз также относятся α -*N*-ацетилгалактозаминид α 2-6-сиалилтрансфераза (ЕС 2.4.99.3), β -галактозид α 2-3-сиалилтрансфераза (ЕС 2.4.99.4), галактозилдиацилглицерол α 2-3-сиалилтрансфераза (ЕС 2.4.99.5), *N*-ацетиллакто-

заминида α 2-3-сиалилтрансфераза (ЕС 2.4.99.6), α -*N*-ацетилнейраминил-2,3- β -галактозил-1,3-*N*-ацетилгалактозаминид α 2-6-сиалилтрансфераза (ЕС 2.4.99.7), α -*N*-ацетилнейраминат α 2-8-сиалилтрансфераза (ЕС 2.4.99.8) и лактозилцерамид α 2-3-сиалилтрансфераза (ЕС 2.4.99.9).

Наличие большого количества сиалилтрансфераз у человека и других животных является еще одним свидетельством многообразия и важной роли соединений, содержащих сиаловую кислоту [22].

Альдолаза *N*-АнейК (*N*-ацетилнейраминат-*N*-ацетилманнозамин лиаза, *N*-acetylneuraminate lyase) (ЕС 4.1.3.3) принимает участие в обратимом альдольном расщеплении *N*-ацетилнейраминовой кислоты на *N*-ацетилманнозамин (ManNAc) и пируват (рис.4).

N-ацетилнейраминат $\rightleftharpoons$ *N*-ацетил-D-маннозамин + пируват.

Сиалат-О-ацетилэстераза (SIAE) (ЕС 3.1.1.53) у млекопитающих имеют две формы: цитозольную (Cse) и лизосомальную / эндосомальную (Lse) [23].

Данный фермент катализирует реакцию удаления О-ацетильных групп из сиаловых кислот путем расщепления сложноэфирной связи 4-О-Ас или 9-О-Ас [24].

N-ацетил-О-ацетилнейраминат + H₂O $\rightarrow$ *N*-ацетилнейраминат + ацетат.

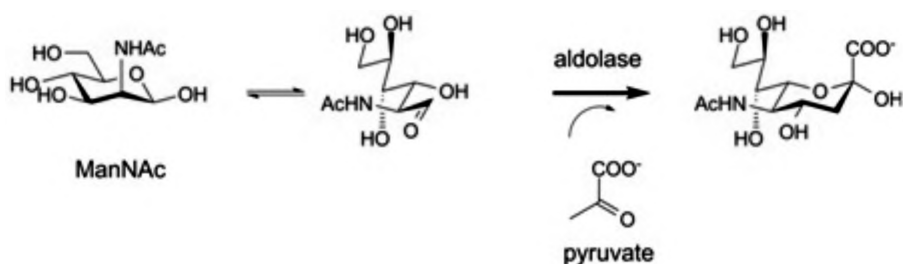


Рис. 4. Уравнение реакции, катализируемой альдозазой *N*-АнейК.

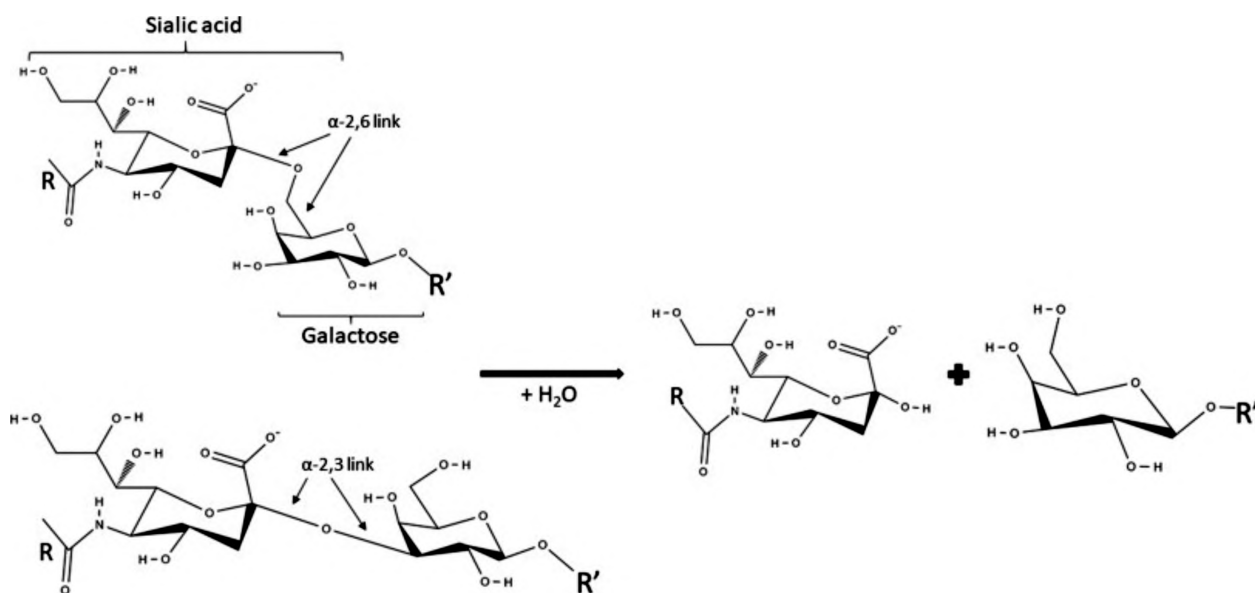


Рис. 5. Реакция, катализируемая сиалидазами. R = -CH₃ (*N*-ацетилнейраминовая кислота); -CH₂OH (*N*-гликолилнейраминовая кислота); R' = олигосахарид, липид, белок и т. д. [49].

9-О-ацетилирование и де-О-ацетилирование являются наиболее распространенными модификациями сиаловых кислот, обнаруживаемых в сиалогликоконъюгатах клеточной поверхности млекопитающих, которые могут изменять размер, гидрофобность, суммарный заряд и антигенность молекул. Эти модификации могут регулировать различные биологические явления, включая распознавание эндогенного лектина, антигенность опухоли, связывание вируса и активацию комплемента [25].

Гемагглютинин вируса гриппа С нуждается в 9-О-ацетилированных сиаловых кислотах для связывания с клетками-хозяевами [26]. Инкубация эритроцитов с сиалат-9-О-ацетилэстеразой изменяла устойчивость эритроцитов к агглютинации вирусом гриппа С [27].

Нейраминидаза (сиалидаза) (ЕС 3.2.1.18) представляет собой экзогликозидазу, катализирующую удаление концевых остатков сиаловых кислот из сиалозидов (сиаловых кислотсодержащих олигосахаридов) и сиалогликоконъюгатов (рис. 5).

У млекопитающих имеется четыре гена, кодирующих ферменты семейства нейраминидаз: нейраминидазу 1 (NEU1), нейраминидазу 2 (NEU2), нейраминидазу 3 (NEU3, также называемую ганглиозидсиалидазой) и нейраминидазу 4 (NEU4) [16, 28]. Эти четыре сиалидазы имеют разную локализацию в организме, проявляя различную субстратную специфичность и физиологические функции. NEU1 находится в лизосомах и участвует в экзоцитозе, иммунном ответе, фагоцитозе и сборке эластичных волокон. NEU2 локализуется в цитозоле и плазматической мембране и участвует в дифференцировке миобластов и нейронов. NEU3 и NEU4 необходимы для дифференцировки нейронов, апоптоза и адгезии, но NEU3 локализован в плазматической мембране, тогда как NEU4 находится в лизосомах или в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме [28].

Нейраминидазы, расположенные на поверхности клеток и во внутриклеточном пространстве, могут, с одной стороны, инициировать катаболизм сиалогликоконъюгатов, и, с другой стороны, отщеплять от них остатки сиаловой кислоты, регулируя, таким образом, их структуру и функции [16].

В отличие от биосинтеза *de novo* сиаловой кислоты у большинства эукариот, некоторые виды простейших, такие как *Trypanosoma cruzi* (возбудитель болезни Шагаса или американского трипаномоза), используют поверхностную $\alpha 2-3$ -транс-сиалидазу для переноса 2–3-связанных остатков сиаловой кислоты непосредственно из сиалильных гликоконъюгатов хозяина на концевые остатки β -галактозы муцинов-паразитов и образуют свои собственные поверхностные сиалильные гликоконъюгаты [22].

Использование сиаловых кислот и ферментов их обмена в медицине. Исходя из вышесказанного, обсуждаются и разрабатываются следующие направления использования сиаловых кислот и ферментов их обмена в медицинской практике:

Изучение и разработка новых методов лечения наследственных заболеваний, связанных с нарушением метаболизма сиаловых кислот у человека [29].

Актуальной проблемой в педиатрии являются врожденные нарушения гликозилирования (CDG) в силу их многочисленности и трудности диагностики [30, 31]. Например, причиной сиалурии, при которой наблюдается повышение уровня свободной сиаловой кислоты, может быть дефект гена GNE и синтез неполноценных ферментов УДФ-*N*-ацетилглюкозамин-2-эпимеразы/*N*-ацетилманнозамин-киназы (OMIM 269921).

Дефицит NEU1 человека приводит к развитию лизосомального сиалидоза (OMIM 256550), приводящего к внутриутробной или младенческой смертности [32].

Анализ степени гликозилирования белков и гликолипидов может использоваться для диагностики различных заболеваний [30, 33].

Оценка изменений гликозилирования специфических гликопротеинов и ганглиозидов, по-видимому, является одним из наиболее многообещающих подходов для определения онкоспецифических маркеров [34].

Для ряда опухолей нейроэктодермального происхождения была показана неоэкспрессия дисиалоганглиозидов, которые играют ключевую роль в инфильтрации опухолевых клеток и образовании метастазов [35], что делает дисиалоганглиозиды привлекательными молекулярными мишенями для иммунотерапии рака [36].

В результате токсического действия этанола в гепатоцитах нарушаются процессы гликозилирования белков и ганглиозидов, что приводит к появлению в крови углеводов-дефицитных гликоконъюгатов, например, углеводов-дефицитного трансферрина [37].

При атеросклерозе в крови появляются десилированные липопротеины низкой плотности, которые способствуют накоплению эфиров холестерина внутри клеток, стимулируют пролиферацию клеток и синтез соединительнотканного матрикса [38].

Определение содержания СК и активности ферментов, участвующих в их обмене, в плазме крови и тканях. Многочисленные литературные данные свидетельствуют о повышении содержания общих и свободных сиаловых кислот в крови и тканях практически при любых воспалительных процессах и экстремальных воздействиях на организм [39 – 42].

Повышенное содержание сиаловых кислот является распространенным явлением для различных злокачественных клеток, которое сопровождается увеличением активности сиалилтрансфераз, снижением активности сиалидазы и/или повышением продукции сиалогликопротеинов [34, 43]. Увеличение количества общих сиаловых кислот, активности сиалилтрансфераз и нейраминидазы в сыворотке или плазме крови как маркеры, по-видимому, показывают хорошую чувствительность к различным типам онкологических заболеваний, но низкую специфичность, что ограничивает их использование для раннего выявления и скрининга рака.

Использование ингибиторов сиалилтрансфераз (ST). Повышенная активность этих ферментов приводит к сверхэкспрессии сиаловых кислот на клеточной

поверхности и способствует развитию таких заболеваний как рак и воспаление. Поэтому сиалилтрансферазы рассматриваются в качестве потенциальных лекарственных мишеней для лечения патологических состояний, поскольку они катализируют реакцию на поздней стадии образования сиалогликана. Таким образом, ингибиторы сиалилтрансфераз представляют медицинский интерес, особенно для лечения рака. К тому же, ингибиторы сиалилтрансфераз являются полезным инструментом для изучения функции сиалилтрансфераз и связанных с ними механизмов [7, 14].

Возможными ингибиторами ST могут быть аналоги сиаловой кислоты, аналоги CMP-сиаловой кислоты, аналоги цитидина и другие [14].

Сиалилтрансферазы бактериального происхождения широко используются для синтеза различных сиалосодержащих структур, поскольку бактериальные ферменты обладают гибкой субстратной специфичностью и продуктивно экспрессируются в клетках *Escherichia coli* [44, 45].

Альдолаза N-АНейК катализирует обратимую реакцию, и поэтому может быть использована для высокоэффективного хемоферментного синтеза структурно разнообразных сиаловых кислот в присутствии избытка пирувата, что также перспективно для создания новых терапевтических средств [46].

Использование ингибиторов сиалидаз.

Ингибиторы нейраминидаз вирусов гриппа человека, такие как Реленза (Занамивир – ZMV) и Тамифлю (Осельтамивир – OTV), были использованы в качестве эффективных лекарственных препаратов против действия вируса гриппа. Однако в последнее время появляются лекарственно устойчивые штаммы, требующие новых противогриппозных препаратов [47].

Патогенные бактериальные сиалидазы нарушают репрессивную иммунную регуляцию взаимодействия на основе сиаловой кислоты и вызывают повреждение тканей хозяина во время бактериального сепсиса. Препарат из двух бактериальных ингибиторов сиалидазы был использован для защиты мышей, умирающих от сепсиса, в модели цекального лигирования и пункции (CLP) [21].

Таким образом, с одной стороны, многочисленные исследования показали, что aberrantное сиалирование является отличительной чертой различных изменений и нарушений обмена веществ в организме. С другой стороны, сиаловые кислоты являются одной из первых точек контакта между многими различными патогенными микроорганизмами и организмом хозяина благодаря их присутствию на наружных поверхностях клеток и тканей слизистой оболочки. Поэтому изучение содержания различных фракций сиаловых кислот и активности ферментов их обмена в плазме крови и в тканях, а также влияние на активность ферментов их обмена с помощью лекарственных препаратов, может внести существенный вклад в диагностику и своевременное лечение многих заболеваний.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-4, 6, 7, 11-15, 17-28, 31-37, 43-47, 49, 50 см. REFERENCES)

1. Видершайн Г.Я. Гликобиология: успехи, проблемы и перспективы. *Биохимия*. 2013; 78(7): 877-900.
2. Чен К., Венг Ю., Ма Ж., Ли Н., Хан В., Жэнг К. и др. Asp141 и цепочка водородных связей Asp141–Asn109–Asp33 обеспечивают активность и структурную стабильность сиалилтрансфераз класса GT80. *Биохимия*. 2015; 80(8): 1289-97.
3. Северов В.В. Синтез олиголактозаминов – лигандов галектинов. Дисс. канд. хим. наук. Москва; 2015.
4. Золотова Н.А. Структурная и функциональная характеристика муцинов. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014; 1: 66-72.
5. Москалев А.В., Сбойчаков В.Б., Апчел А.В., Цыган В.Н. Роль сиаловых кислот в поддержании иммунного гомеостаза. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2018; 3(63): 233-7.
6. Пшежецкий А.В., Ашмарина Л.И. Десилирование поверхностных рецепторов: новое направление в регуляции клеточных сигнальных систем. *Биохимия*. 2013; 78(7): 949-61.
7. Алрой Д., Гарганта Ч., Видершайн Г. Вторичные биохимические и морфологические последствия при лизосомальных болезнях накопления. *Биохимия*. 2014; 79(7): 782-801.
8. Иванов Д.О., Новикова В.П., Похлебкина А.А. Врожденные нарушения гликозилирования. *Педиатр*. 2018; 9(3): 5–15. doi: 10.17816/PED935-15.
9. Рыжкова А.И., Карагодин В.П., Сухоруков В.Н., Сазонова М.А., Орехов А.Н. Десилированные липопротеины низкой плотности в крови человека. *Клиническая медицина*. 2017; 95(3): 216-21.
10. Миллер Д.А., Миллер Т.М., Некрасова И.Л., Колесная Т.М., Галочкина А.Б. Сиаловые кислоты – показатель активности воспаления СОЖ у больных хроническим гастритом. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2013; 10:36-7.
11. Вольхина И.В., Наумова Н.Г. Сравнительный анализ изменений показателей обмена биополимеров соединительной ткани в стенке желудка при иммобилизации у крыс с различной устойчивостью к стрессу. *Вестник Удмуртского государственного университета*. 2012; 1: 55-8.
12. Вольхина И.В., Бутолин Е.Г., Скворцова Е.А. Влияние липоевой кислоты на обмен сиалосодержащих соединений в плазме крови крыс с аллоксановым диабетом. *Педиатр*. 2018; 9(5): 36-40. doi: 10.17816/PED9536-40
13. Протасова С.В., Бутолин Е.Г., Оксюзян А.В. Обмен углеводсодержащих биополимеров в печени и слизистой желудка при экспериментальном диабете у крыс с различной устойчивостью к стрессу. *Сахарный диабет*. 2010; 1:10-2.
14. Штыря Ю.А., Мочалова Л.В., Бовин Н.В. Нейраминидаза вируса гриппа: структура и функция. *Acta naturae*. 2009; 2: 28-34.

REFERENCES

1. Vidershayn G. Ya. Glycobiology: successes, problems and prospects. *Biokhimiya*. 2013; 78(7): 877-900. (in Russian)
2. Schengrund C.L. Gangliosides: glycosphingolipids essential for normal neural development and function. *Trends Biochem Sci*. 2015; 40(7): 397-406. doi: 10.1016/j.tibs.2015.03.007.
3. Corfield A. Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochem Cell Biol*. 2017; 147(2): 119-47. doi: 10.1007/s00418-016-1526-4.
4. Vasta G.R., Ahmed H., eds. (2009) *Animal Lectins. A Functional View*, CRC Press, Taylor & Frances Group, Boca Raton, FL, USA.
5. Chen K., Veng Y., Ma Z., Li N., Khan V., Zheng K. et al. Asp141 and the Asp141 – Asn109 – Asp33 hydrogen bond chain ensure the activity and structural stability of sialyltransferases of the GT80 class. *Biokhimiya*. 2015; 80(8): 1289-97. (in Russian)
6. Noel M., Gilormini P.A., Cogez V., Yamakawa N., Vicogne D., Lion C. et al. Probing the CMP-Sialic Acid Donor Specificity of Two Human β -d-Galactoside Sialyltransferases (ST3Gal I and ST6Gal I) Selectively Acting on O- and N-Glycosylproteins. *Chem. Bio. Chem*. 2017; 4; 18 (13): 1251-9. doi: 10.1002 / cbic.201700024.
7. Heise T., Pijnenborg J., Büll C., van Hilten N., Kers-Rebel E., Balneger N. et al. Potent Metabolic Sialylation Inhibitors Based on C-

- 5-Modified Fluorinated Sialic Acids. *J. Med. Chem.* 2019; 62 (2): 1014-21. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01757.
8. Severov V.V. Synthesis of oligolactosamines – ligands of galectins. Diss. Moscow; 2015. (in Russian)
9. Zolotova N.A. Structural and functional characteristics of mucins. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya*. 2014; 1: 66-72. (in Russian)
10. Moskalev A.V., Sboychakov V.B., Apchel A.V., Tsygan V.N. The role of sialic acids in maintaining immune homeostasis. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2018; 3(63): 233-7. (in Russian)
11. Kundra R., Kornfeld S. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(43):31039-46.
12. Bremer E. G., Schlessinger J., Hakomori S. Gangliosidemediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 1986; 261 (5): 2434-40.
13. Mutoh T., Tokuda A., Miyadai T., Hamaguchi M., & Fujiki N. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92 (11): 5087-91. doi: 10.1073/pnas.92.11.5087.
14. Wang X. Q., Sun P., Paller A. S. Gangliosides inhibit urokinase-type plasminogen activator (uPA)-dependent squamous carcinoma cell migration by preventing uPA receptor/alpha beta integrin/epidermal growth factor receptor interactions. *J. Invest. Dermatol.* 2005; 124 (4): 839-48.
15. Furukawa K., Hamamura K., Aixinjuelo W., Furukawa K. Biosignals modulated by tumor-associated carbohydrate antigens: novel targets for cancer therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1086: 185-98.
16. Pshezhetskiy A.V., Ashmarina L.I. Desialation of surface receptors: a new direction in the regulation of cellular signaling systems. *Biokhimiya*. 2013; 78(7): 949-61. (in Russian)
17. Gavella M., Lipovac V., Sverko V. Erythrocyte sialic acid alterations in experimental diabetes. *Cell and Mol. Biol.* 1985; 31 (2): 75-80.
18. Varki A., Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2012 Apr; 1253(1): 16-36.
19. Kean E.L., Münster-Kühnel A.K., Gerardy-Schahn R. CMP-sialic Acid Synthetase of the Nucleus. *Biochim. Biophys. Acta*. 2004; 1673 (1-2):56-65. doi: 10.1016/j.bbagen.2004.04.006.
20. Sellmeier M., Weinhold B., Münster-Kühnel A. CMP-Sialic Acid Synthetase: The Point of Constriction in the Sialylation Pathway. *Top Curr Chem*, 2015; 366: 139-67. doi: 10.1007 / 128_2013_477.
21. Chen X., Varki A. Advances in the Biology and Chemistry of Sialic Acids. *ACS Chem. Biol.* 2010; 5(2):163-76. doi: 10.1021/cb900266r.
22. Li Y., Chen X. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012; 94(4):887-905. doi: 10.1007/s00253-012-4040-1.
23. Takematsu H., Diaz S., Stoddart A., Zhang Y., Varki A. Lysosomal and cytosolic sialic acid 9-O-acetyltransferase activities can be encoded by one gene via differential usage of a signal peptide-encoding exon at the N terminus. *J. Biol. Chem.* 1999 Sep 3;274(36):25623-31.
24. Wasik B.R., Barnard K.N., Parrish C.R. Effects of Sialic Acid Modifications on Virus Binding and Infection. *Trends Microbiol.* 2016; 24(12): 991-1001. doi: 10.1016/j.tim.2016.07.005.
25. Schauer R. Biosynthesis and function of N- and O-substituted sialic acids. *Glycobiology*. 1991;1(5):449-52. doi: 10.1093/glycob/1.5.449.
26. Herrler G., Klenk H.D. The surface receptor is a major determinant of the cell tropism of influenza C virus. *Virology*. 1987;159(1):102-8.
27. Schultze B., Gross H.J., Brossmer R., Klenk H.D., Herrler G. Hemagglutinating encephalomyelitis virus attaches to N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid-containing receptors on erythrocytes: comparison with bovine coronavirus and influenza C virus. *Virus Res.* 1990;16(2):185-94.
28. Miyagi T. Physiological and pathological roles of mammalian sialidases. *Seikagaku*. 2008; 80(1):13-23.
29. Alroy D., Garganta Ch., Vidershay G. Secondary biochemical and morphological consequences in lysosomal storage diseases. *Biokhimiya*. 2014; 79(7):782-801. (in Russian)
30. Ivanov D.O., Novikova V.P., Pokhlebkina A.A. Congenital disorders of glycosylation. *Pediatr.* 2018; 9(3): 5-15. doi: 10.17816/PED935-15. (in Russian)
31. Cylwik B, Naklicki M, Chrostek L, Gruszewska E. Congenital disorders of glycosylation. Part I. Defects of protein N-glycosylation. *Acta Biochim. Pol.* 2013;60(2):151-61.
32. Urbanski G., Bekri S., Bath M., Verny C., Lavigne C.A. Case of Type I Sialidosis With Osteonecrosis Revealing a New Mutation in NEU1. *J. inborn errors metab. screen.* 2019; 2 Porto Alegre. 2014. Epub July 15, 2019.
33. Anttila P., Jarvi K., Latvala J., Blake J., Niemela O. Diagnostic characteristics of different carbohydrate-deficient transferrin methods in the detection of problem drinking: effects of liver disease and alcohol consumption. *Alcohol Alcohol.* 2003; 38: 415-20.
34. Zhang Z., Wuhler M., Holst S. Serum sialylation changes in cancer. *Glycoconj J.* 2018; 35(2): 139-60.
35. Furukawa K., Hamamura K., Aixinjuelo W., Furukawa K. Biosignals Modulated by Tumor-Associated Carbohydrate Antigens: Novel Targets for Cancer Therapy. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2006; 1086:185-98. doi: 10.1196/annals.1377.017.
36. Daly J., Carlsen M., O'Dwyer M. Sugar Free: Novel Immunotherapeutic Approaches Targeting Siglecs and Sialic Acids to Enhance Natural Killer Cell Cytotoxicity Against Cancer. *Front Immunol.* 2019; 10: 1047. Published online 2019 May 9. doi: 10.3389/fimmu.2019.01047.
37. Garige M., Azuine M.A., Lakshman M.R. Chronic ethanol consumption down-regulates CMP-NeuAc:GM3 alpha 2,8-sialyltransferase (ST8Sia-1) gene in the rat brain. *Neurochem. Int.* 2006; 49(3): 312-8.
38. Ryzhkova A.I., Karagodin V.P., Sukhorukov V.N., Sazonova M.A., Orekhov A.N. Desialated low density lipoproteins in human blood. *Klinicheskaya meditsina*. 2017; 95(3): 216-21. (in Russian)
39. Miller D.A., Miller T.M., Nekrasova I.L., Kolesnaya T.M., Galochkina A.B. Sialic acids are an indicator of the activity of inflammation of the coolant in patients with chronic gastritis. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2013; 10: 36-7. (in Russian)
40. Vol'khina I.V., Naumova N.G. Comparative analysis of changes in the metabolic parameters of connective tissue biopolymers in the stomach wall during immobilization in rats with different resistance to stress. *Vestnik Udmurtskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2012;1: 55-8. (in Russian)
41. Vol'khina I.V., Butolin E.G., Skvortsova E.A. The effect of lipoic acid on the exchange of sialic compounds in the blood plasma of rats with alloxan diabetes. *Pediatr.* 2018; 9(5): 36-40. doi: 10.17816/PED9536-40 (in Russian)
42. Protasova S.V., Butolin E.G., Oksuzyan A.V. Metabolism of carbohydrate-containing biopolymers in the liver and gastric mucosa in experimental diabetes in rats with different resistance to stress. *Diabet.* 2010; 1:10-2. (in Russian)
43. Zhao Y., Wei A., Zhang H., Chen X., Wang L., Zhang H. et al. Alpha2,6-Sialylation mediates hepatocellular carcinoma growth in vitro and in vivo by targeting the Wnt/beta-catenin pathway. *Oncogenesis*. 2017; 6 (5): 343-52.
44. Yamamoto T. Marine bacterial sialyltransferases. *Mar. Drugs*. 2010; 8: 2781-94.
45. Yu H., Chokhawala, H.A., Huang S., and Chen X. One pot three enzyme chemoenzymatic approach to the synthesis of sialosides containing natural and non natural functionalities *Nature Protoc.* 2006; 1: 2485-92.
46. Huynh N., Aye A., Li Y., Yu H., Cao H., Tiwari V.K., Shin D.W., Chen X., Fisher A.J. Structural basis for substrate specificity and mechanism of N-acetyl-D-neuraminic acid lyase from *Pasteurella multocida*. *Biochemistry*. 2013; 52(47): 8570-9. doi: 10.1021/bi4011754.
47. Shtyrya Yu.A., Mochalova L.V., Bovin N.V. Influenza virus neuraminidase: structure and function. *Acta naturae*. 2009; 2: 28-34. (in Russian)
48. Volkert G., Worrall L., Kwan D., Yu C.C. et al. Structure of human ST8SiaIII sialyltransferase provides insight into cell-surface polysialylation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2015; (22):627-35. doi: 10.1038/nsmb.3060.
49. Glanz V.Y., Myasoedova V.A., Grechko A.V., Orekhov A.N. Sialidase activity in human pathologies. *Eur. J. Pharmacol.* 2019;842:345-50. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.11.014

Поступила 12.02.21
Принята к печати 12.03.21

Попова И.Г., Ситникова О.Г., Назаров С.Б., Садов Р.И., Панова И.А., Баев Т.О., Кузьменко Г.Н., Харламова Н.В., Клычева М.М., Веселкова Ю.Н.

СОДЕРЖАНИЕ СЕРОВОДОРОДА У ЖЕНЩИН С УМЕРЕННОЙ И ТЯЖЕЛОЙ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ В III ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ И ИХ НОВОРОЖДЕННЫХ

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава РФ, 153045, Иваново, Россия

Обследованы 70 женщин в сроке беременности 22-40 недель и родившихся у них новорожденных. Из них 15 женщин с умеренной преэклампсией (ПЭ) составили 1 группу, 22 женщины с тяжелой ПЭ – 2 группу и 33 женщины с неосложненным течением беременности без гипертензивных расстройств – контрольная группа. Забор крови у женщин проводился при поступлении в клинику, у новорожденных кровь забирали на 3-5 сутки жизни. Концентрацию сероводорода (H_2S) определяли по методу К. Ку и соавт. [17]. Установлено снижение уровня сероводорода в сыворотке крови женщин, беременность которых осложнилась тяжелой преэклампсией. У новорожденных, родившихся у матерей с преэклампсией, выявлено в крови увеличение концентрации сероводорода, что, вероятно, является компенсаторной реакцией, направленной на восстановление сосудистого гомеостаза в период ранней постнатальной адаптации.

Ключевые слова: новорожденные; беременные; преэклампсия; гипертензивные расстройства; сероводород.

Для цитирования: Попова И.Г., Ситникова О.Г., Назаров С.Б., Садов Р.И., Панова И.А., Баев Т.О., Кузьменко Г.Н., Харламова Н.В., Клычева М.М., Веселкова Ю.Н. Содержание сероводорода у женщин с умеренной и тяжелой преэклампсией в III триместре беременности и их новорожденных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (7): 396-400. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-396-400>

Popova I.G., Sitnikova O.G., Nazarov S.B., Sadov R.I., Panova I.A., Baev T.O., Kuzmenko G.N., Kharlamova N.V., Klycheva M.M., Veselkova Yu.N.

HYDROGEN SULFIDE CONTENT IN WOMEN WITH MODERATE AND SEVERE PREECLAMPSIA IN THE THIRD TRIMESTER OF PREGNANCY AND THEIR NEWBORNS

Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood named after V.N. Gorodkov, 153045, Ivanovo, Russian Federation

We examined 70 women who were 22-40 weeks pregnant and their newborns. Of these, 15 women with moderate PE made up group 1, 22 women with severe PE-group 2, and 55 women with uncomplicated pregnancy without hypertensive disorders-the control group. Blood was collected from women when they were admitted to the clinic, and blood was taken from newborns for 3-5 days of life. The concentration of hydrogen sulfide was determined by the method of K. Qu et al [17]. There was a decrease in the level of hydrogen sulfide in the blood serum of women whose pregnancy was complicated by severe preeclampsia. In newborns born to mothers with preeclampsia, an increase in the concentration of hydrogen sulfide was detected in the blood, which is probably a compensatory reaction aimed at restoring vascular homeostasis during early postnatal adaptation.

Key words: newborns; pregnant women; preeclampsia; hypertensive disorders; hydrogen sulfide.

For citation: Popova I.G., Sitnikova O.G., Nazarov S.B., Sadov R.I., Panova I.A., Baev T.O., Kuzmenko G.N., Kharlamova N.V., Klycheva M.M., Veselkova YU.N. Hydrogen sulfide content in pregnant women with preeclampsia in late gestation and their newborns. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical laboratory diagnostics)*. 2021; 66 (7) 396-400 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-396-400>

For correspondence: Popova Irina Gennadievna, candidate of medical sciences, researcher of laboratory of clinical biochemistry and genetics; e-mail: i_g_popova@mail.ru

Information about authors:

Popova I.G., <http://orcid.org/0000-0003-1836-3523>;
Sitnikova O.G., <http://orcid.org/0000-0003-2604-0724>;
Nazarov S.B., <http://orcid.org/0000-0003-1545-7655>;
Sadov R.I., <http://orcid.org/0000-0002-8776-7743>;
Panova I.A., <http://orcid.org/0000-0002-0828-6547>;
Baev T.O., <http://orcid.org/0000-0002-8198-0316>;
Kuzmenko G.N., <http://orcid.org/0000-0001-5772-9271>;
Kharlamova N.V., <http://orcid.org/0000-0003-2867-1693>;
Klycheva M.M., <http://orcid.org/0000-0002-1725-8505>;
Veselkova Yu.N., <https://orcid.org/0000-0002-7485-1903>.

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

Acknowledgment. The study is supported by RFBR grant № 18-415-370002.

Received 29.06.2020
Accepted 19.03.2021

Введение. Известно, что преэклампсия (ПЭ) – мульти-системное патологическое состояние, возникающее во второй половине беременности (после 20-й недели), характеризующееся артериальной гипертензией в сочетании с протеинурией, нередко отеками, и проявлениями полиорганной недостаточности [1]. В настоящее время в патогенезе преэклампсии выделяется несколько концепций развития этого осложнения беременности, рассматривается роль нарушения ангиогенных механизмов, продукции оксида азота, а также роли аутоантител и окислительного стресса [2]. Считается, что пусковым моментом развития ПЭ является дисфункция эндотелия, которая лежит в основе нарушения ремоделирования спиральных артерий, что ведет к снижению перфузии и развитию гипоксии в тканях [3,4,5]. Немаловажную роль в патофизиологии преэклампсии играет плацентарный окислительный стресс, являющийся результатом недостаточного ремоделирования спиральных артерий [6].

Отмечено, что для нормального функционирования плацентарного сосудистого русла необходим сероводород (H_2S) [7]. H_2S – газообразный мессенджер, продуцируемый главным образом цистатион-γ-лиазой (CSE), является проангиогенным вазодилатором. Снижение экспрессии CSE в плаценте, определяемой полимеразной цепной реакцией в реальном времени, способствует нарушению ангиогенного баланса во время беременности, что может привести к нарушению плацентации и развитию гипертензии и преэклампсии у матери. [8,10]. Ряд исследователей на экспериментальной модели ПЭ у грызунов показали, что при ПЭ возникает снижение активности васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF), и увеличение антиангиогенного фактора – растворимой fms-подобной тирозинкиназы-1 (sFlt-1) [9]. В условиях дисбаланса ангиогенных факторов роста система H_2S /CSE ограничивает экспрессию sFlt-1 и растворимого эндоглина (sEng) и способствует восстановлению плацентарной сосудистой сети, тем самым препятствует развитию симптомов ПЭ и способствует улучшению условий для роста и развития плода у мышей [10]. Эндогенный H_2S является регулятором кровяного давления, индуцирует вазорелаксацию через АТФ-чувствительные калиевые каналы в сосудистых гладкомышечных клетках [11]. Выявлена роль этого газа в воспалительных процессах, а также рассматривается возможность его использования для коррекции метаболических нарушений в легких и сердечно-сосудистой системе [12]. Отмечено нейротекторное и антиоксидантное действие H_2S при

исследовании тканей мозга беременных крыс [13, 14]. Показано, что в низких концентрациях H_2S способен проявлять антиоксидантный эффект путем взаимодействия с активными формами кислорода (АФК) и пероксинитритом (ONOO–), в высоких концентрациях H_2S оказывает наоборот цитотоксическое действие на клетки [8].

В ранее проведенных нами исследованиях выявлено, что у новорожденных уровень H_2S , определяемый в пуповинной крови, является значимым фактором прогнозирования функционирующего артериального протока [14], маркером для прогнозирования внутрижелудочковых кровоизлияний (ВЖК) у новорожденных [15, 16].

В доступной литературе, данные о содержании H_2S в крови женщин, беременность которых осложнилась преэклампсией разной степени тяжести, и в крови новорожденных, родившихся у матерей с ПЭ практически отсутствуют.

Цель исследования – определить содержание H_2S у женщин с преэклампсией разной степени тяжести в III триместре беременности и их новорожденных.

Материал и методы. Взятие крови на исследование проводили у 70 беременных в срок гестации 22-40 недель, поступивших в акушерскую клинику «Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава России и их новорожденных. Все пациентки при поступлении в клинику подписали информированное согласие на обследование, включающее взятие крови у них и их новорожденных, на что имелось одобрение этического комитета. Основную группу составили 37 беременных с ПЭ разной степени тяжести, которая в зависимости от степени тяжести ПЭ была разделена на 2 группы: в первую вошли 15 беременных с умеренной ПЭ и их новорожденные дети; во вторую группу – 22 пациентки с тяжелой ПЭ и их новорожденные дети. Контрольную группу составили 33 женщины без признаков ПЭ и их новорожденные дети.

Концентрацию H_2S определяли по методу K. Qu, C.P.L.H. Chen, B. Halliwell и соавт. [17]. Математическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 («StatSoft»). Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3). Использовали критерии Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова для определения статистической значимости в случае независимых выборок и критерий Вилкоксона при парных сравнениях. Все результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (95% уровень статистической значимости).

Таблица 1

Показатели сероводорода в крови беременных женщин с преэклампсией разной степени тяжести

Признак	Контрольная группа, $n=33$	Основная группа с ПЭ, $n=37$	1 группа с умеренной ПЭ, $n=15$	2 группа с тяжелой ПЭ, $n=22$
H_2S , мкмоль/л	71,5 [61; 82]	58,5 [43; 74]	56,5 [52; 74]	52,5 [43; 58]
p_i				0,009

Примечание. Здесь и в табл.2: n – число больных, p_i – достоверные отличия в сравнении с контрольной группой. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3).

Результаты. Данные исследований содержания H_2S у беременных и их новорожденных представлены в табл. 1.

При анализе результатов исследований выявлено, что у беременных женщин с преэклампсией содержание H_2S в сыворотке крови имело тенденцию к снижению по сравнению с женщинами контрольной группы, однако без достоверных различий. У пациенток, беременность которых осложнилась тяжелой ПЭ содержание H_2S было в 1,4 раза снижено по сравнению с женщинами группы контроля ($p = 0,0090$). Достоверных различий при сравнении результатов в группах в зависимости от степени тяжести преэклампсии не выявлено.

Данные исследований содержания H_2S у новорожденных представлены в табл. 2.

У новорожденных, родившихся у матерей с преэклампсией, содержание H_2S в сыворотке крови было повышено в 1,3 раза по сравнению с группой новорожденных от матерей контрольной группы ($p = 0,018$), причем повышение показателя отмечено у новорожденных, родившихся у матерей с умеренной и тяжелой ПЭ ($p = 0,016$, $p = 0,018$). Достоверных различий в содержании H_2S в сыворотке крови ново-

рожденных, родившихся от матерей с умеренной и тяжелой преэклампсией, не выявлено.

Данные корреляционного анализа у новорожденных от матерей с ПЭ представлены в табл. 3.

По данным корреляционного исследования у новорожденных, родившихся у матерей с ПЭ выявлены положительные взаимосвязи между содержанием H_2S в крови и степенью тяжести дыхательной недостаточности и церебральной ишемии, а также отрицательные с оценкой состояния ребенка по шкале Апгар и его соматометрическими показателями.

Обсуждение. Как показали многочисленные исследования, одной из систем, где сероводород играет ключевую роль как сигнальная молекула, является сердечно-сосудистая система, в частности – кровеносные сосуды. В сосудах артериального русла он принимает активное участие в регуляции артериального давления [18]. Исследования W. Zhao и соавт. [19] показали, что уровень H_2S в крови у больных артериальной гипертензией был снижен по сравнению с группой лиц с нормальными показателями артериального давления. По данным нашего исследования выявлено, что у беременных при ПЭ было снижено содержание H_2S в крови, что является проявлением

Таблица 2

Показатели сероводорода в крови новорожденных, родившихся у матерей с ПЭ разной степени тяжести

Признак	Новорожденные от матерей контрольной группы, $n=33$	Новорожденные от матерей основной группы с ПЭ, $n=37$	Новорожденные от матерей с умеренной ПЭ, $n=15$	Новорожденные от матерей с тяжелой ПЭ, $n=22$
H_2S , мкмоль/л	33,5 [23; 43]	43 [26; 58]	40 [26; 52]	42 [28; 58]
p_1		0,018	0,016	0,018

Таблица 3

Корреляционные взаимосвязи у новорожденных, родившихся у матерей с ПЭ

Новорожденные, родившиеся у матерей с умеренной ПЭ		r
H_2S	Степень тяжести внутриутробной пневмонии	0,81
H_2S	Степень тяжести дыхательной недостаточности	0,80
H_2S	Степень тяжести церебральной ишемии	0,54
H_2S	Степень тяжести внутрижелудочковых кровоизлияний	0,81
H_2S	Масса ребенка	-0,78
H_2S	Рост ребенка	-0,73
H_2S	Оценка по шкале Апгар	-0,78
Новорожденные, родившиеся у матерей с тяжелой ПЭ		r
H_2S	Степень тяжести внутриутробной пневмонии	0,74
H_2S	Степень тяжести дыхательной недостаточности	0,80
H_2S	Степень тяжести церебральной ишемии	0,66
H_2S	Степень тяжести внутрижелудочковых кровоизлияний	0,64
H_2S	Степень тяжести анемии	0,34
H_2S	Масса ребенка	-0,61
H_2S	Рост ребенка	-0,78
H_2S	Оценка по шкале Апгар	-0,55

дисфункциональных изменений эндотелия и плацентарной недостаточности. Отмечено более выраженное снижение содержания сероводорода у беременных с тяжелой ПЭ, что позволяет использовать этот показатель в дополнение к общепринятым исследованиям при оценке тяжести преэклампсии у женщин.

D.L. Gumina и соавт. [20] отмечено, что у детей, родившихся у матерей с преэклампсией, развивается эндотелиальная дисфункция, которая может привести к развитию патологии периода новорожденности. Дисфункция эндотелия лежит в основе нарушений микроциркуляции и развития расстройств церебральной гемодинамики, сердечно-сосудистых нарушений у детей [14, 16]. Известно, что сероводород в организме проявляет свойства сигнальной молекулы и выполняет функции регулятора кровяного давления, нейротрансмиттера, иммуномодулятора и анти-апоптозного агента, а также оказывает противовоспалительное действие [21]. У обследованных нами новорожденных, родившихся у матерей с преэклампсией, отмечено повышение уровня H_2S в крови, что, вероятно, является компенсаторной реакцией, направленной на восстановление сосудистого гомеостаза в период ранней постнатальной адаптации. Выявленные корреляционные взаимосвязи содержания H_2S в крови новорожденных от матерей с ПЭ и показателями состояния здоровья детей подтверждают полученные результаты, что позволяет использовать H_2S как маркер для оценки тяжести выявленных перинатальных нарушений.

Выводы

1. Установлено снижение содержания сероводорода в сыворотке крови женщин, беременность которых осложнилась тяжелой преэклампсией.

2. Выявлено увеличение содержания сероводорода в крови новорожденных, родившихся у матерей с преэклампсией, уровни H_2S коррелируют с показателями состояния здоровья новорожденных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование поддержано грантом РФФИ № 18-415-370002.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4, 5, 7, 9-13, 17-21 см. REFERENCES)

- Адамян Л.В., Серова В.Н., Сухих Г.Т., Филиппова О.С. Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия. Клинические рекомендации (протокол лечения). *Проблемы репродукции*. 2017; 23(6): 80-174.
- Панова И.А., Рокотянская Е.А., Кузьменко Г.Н., Кудряшова А.В., Попова И.Г., Сытова Л.А., Назаров С.Б., Хлипунуова Д.А. Маркеры воспалительной реакции и дисфункции эндотелия у беременных с гипертензивными расстройствами различного генеза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 10 (61): 692-6.
- Иванова А.С., Попова И.Г., Назаров С.Б. Состояние NO-зависимых механизмов в плаценте и у плодов белых крыс при нормальной беременности и на фоне нарушения маточно-плацентарного кровообращения. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2011; 2: 32-5.
- Колесников С.И., Власов Б.Я., Колесникова Л.И. Сероводород как третья эссенциальная газовая молекула живых тканей.

Вестник РАМН. 2015; 70(2): 237-41. DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1318.

- Харламова Н.В., Фисюк Ю.А., Ситникова О.Г., Горожанина Т.З., Назаров С.Б. Исследование сероводорода в пуповинной крови для прогнозирования функционирования артериального протока у глубоко недоношенных новорожденных. *Педиатрия*. 2019; 5: 19-26. DOI: 10.17816/PED10519-26.
- Назаров С.Б., Попова И.Г., Ситникова О.Г., Малышкина А.И., Кузьменко Г.Н., Чаша Т.В., Харламова Н.В. Способ прогнозирования внутрижелудочковых кровоизлияний у новорожденных. Патент RU 2676703 C1; 2019.
- Попова И.Г., Ситникова О.Г., Назаров С.Б., Кузьменко Г.Н., Клычева М.М., Харламова Н.В., Фисюк Ю.А., Абрамова И.В. Исследование содержания сероводорода в пуповинной крови для прогнозирования внутрижелудочковых кровоизлияний у новорожденных. *Таврический медико-биологический вестник*. 2018; 2-2 (21): 117-9.

REFERENCES

- Adamyan L.V., Serova V.N., Suhik G.T., Filippova O.S. Hypertensive disorders during pregnancy, childbirth, and the postpartum period. Preeclampsia. Eclampsia. Clinical recommendations (treatment Protocol). *Problemy reproduktivnoy*. 2017; 23(6): 80-174. (in Russian)
- Phipps E., Prasanna D., Brima W., Jim B. Preeclampsia: Updates in Pathogenesis, Definitions, and Guidelines. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 11(6): 1102-13. DOI: 10.2215/CJN.12081115.
- Panova I.A., Rokotyanskaya E.A., Kuz'menko G.N., Kudryashova A.V., Popova I.G., Sytova L.A., Nazarov S.B., Hlipunova D.A. Markers of inflammatory response and endothelial dysfunction in pregnant women with hypertensive disorders of various Genesis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 10 (61): 692-6. (in Russian)
- Cindrova-Davies T. The therapeutic potential of antioxidants, ER chaperones, NO and H2S donors, and statins for treatment of preeclampsia. *Front Pharmacol.* 2014; 5: 119-21. DOI: 10.3389/fphar.2014.00119.
- Pisaneschi S., Boldrini A., Genazzani A.R., Cocci F., Simoncini T. Feto-placental vascular dysfunction as a prenatal determinant of adult cardiovascular disease. *Intern. Emerg. Med.* 2013; 8(1): 41-5. DOI: 10.1007/s11739-013-0925-y.
- Ivanova A.S., Popova I.G., Nazarov S.B. the State of NO-dependent mechanisms in the placenta and fetuses of white rats during normal pregnancy and against the background of disorders of uteroplacental blood circulation. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2011; 2: 32-5. (in Russian)
- Holwerda K.M., Karumanchi S.A., Lely A.T. Hydrogen sulfide: role in vascular physiology and pathology. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2015; 24(2): 170-6. DOI: 10.1097 / MNH.0000000000000096.
- Kolesnikov S.I., Vlasov B.Ya., Kolesnikova L.I. hydrogen Sulfide as the third essential gas molecule of living tissues. *Vestnik RAMN*. 2015; 70(2): 237-41. DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1318. (in Russian)
- Ahmed A., Rezai H., Broadway-Stringer S. Evidence-Based Revised View of the Pathophysiology of Preeclampsia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017; 956: 355-74. DOI: 10.1007/5584_2016_168.
- Wang K., Ahmad S., Cai M., Rennie J., Fujisawa T., Crispi F. et al. Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. *Circulation*. 2013; 127(25): 2514-22. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001631.
- Elsej D.J., Elsej D.J., Fowkes R.C., Baxter G.F. L-cysteine stimulates hydrogen sulphide synthesis in myocardium, associated with attenuation of ischemia-reperfusion injury. *J. Cardiovasc. Pharm. Therap.* 2010; 1(15): 53-9.
- Liu Y.H., Yan C.D., Bian J.S. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the vascular system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2011; 58(6): 560-9. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31820eb7a1.

13. Yakovleva O.V., Ziganshina A.R., Dmitrieva S.A., Arslanova A.N., Yakovlev A.V., Minibayeva F.V. et al. Hydrogen Sulfide Ameliorates Developmental Impairments of Rat Offspring with Prenatal Hyperhomocysteinemia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018; 12: 13. DOI: 10.1155/2018/2746873.
14. Kharlamova N.V., Fisyuk YU.A., Sitnikova O.G., Gorozhanina T.Z., Nazarov S.B. Investigation of hydrogen sulfide in umbilical cord blood for predicting the functioning of the arterial duct in deep-premature newborns. *Pediatr*. 2019; 5: 19-26. DOI: 10.17816/PED10519-26. (in Russian)
15. Nazarov S.B., Popova I.G., Sitnikova O.G., Malyshkina A.I., Kuzmenko G.N., Chasha T.V., Kharlamova N.V. Method for predicting intraventricular hemorrhages in newborns. Patent RU 2676703 C1; 2019. (in Russian)
16. Popova I.G., Sitnikova O.G., Nazarov S.B., Kuzmenko G.N., Klycheva M.M., Kharlamova N.V., Fisyuk Yu.A., Abramova I.V. Investigation of the content of hydrogen sulfide in umbilical cord blood for the prediction of intraventricular hemorrhages in newborns. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskiy vestnik*. 2018; 2-2 (21):117-9.(in Russian)
17. Qu K., Chen C.P.L.H., Halliwell B., DPhil DSc. Hydrogen Sulfide Is a Mediator of Cerebral Ischemic. *Damage Stroke*. 2006; 2: 889-93.
18. Wang R. Hypothesis Free Access. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J*. 2002; 16(13): 1792-8. DOI: 10.1096/fj.02-0211hyp.
19. Zhao W., Zhang J., Lu Y., Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J*. 2001; 20: 6008-16. DOI: 10.1093/emboj/20.21.6008.
20. Gumina D.L., Black C.P., Balasubramaniam V., Winn V.D., Baker C.D. Umbilical Cord Blood Circulating Progenitor Cells and Endothelial Colony-Forming Cells Are Decreased in Preeclampsia. *Reprod Sci*. 2017; 24 (7): 1088-96. DOI: 10.1177/1933719116678692.
21. Kimura H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxid. Redox Signal*. 2014; 20: 783-93.

Поступила 29.06.20
Принята к печати 19.03.21

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Добровольская М.М., Зубрихина Г.Н., Блиндарь В.Н., Сытов А.В.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ЭНДОГЕННАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

ФБГУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва, Россия

В сыворотке крови 93 онкологических больных с различной локализацией злокачественного процесса определяли показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ): содержание оксида азота (NO), уровень супероксиддисмутазы (СОД), малонового диальдегида (МДА) и глутатиона в эритроцитах. 9 больных раком яичников обследованы в процессе химиотерапии (6 курсов), 40 больных раком толстой кишки, ранее оперированных, были со злокачественным поражением печени. У 39 больных с анемией сопоставлены показатели NO с уровнем интерлейкина 6 (ИЛ-6) и гепсидина-25 (ГП-25). В качестве контроля обследованы 60 практически здоровых лиц. Показано, что содержание NO достоверно снижено у 69,7% больных независимо от локализации первичной опухоли. Отмечалось постепенное повышение содержания NO перед каждым курсом химиотерапии. Высокая концентрация NO (более 22 мкмоль/л) была выявлена у 22 больных с функциональным дефицитом железа (ФДЖ) на фоне анемии хронических заболеваний (АХЗ), которая сопровождалась гиперэкспрессией ИЛ-6 ($27,0 \pm 10,5$ пг/мл) и ГП-25 ($25,2 \pm 7,1$ нг/мл). Напротив, самые низкие показатели NO (менее 22 мкмоль/л) отмечены у 17 больных с ЖДА. Не вызывает сомнений, что существует определённая взаимосвязь между развитием окислительного стресса с накоплением высокотоксичных продуктов липопероксидации, влияющих на общий гомеостаз организма, и развитием анемического синдрома.

Ключевые слова: онкологические больные; окислительный стресс; оксид азота; химиотерапия; анемия.

Для цитирования: Добровольская М.М., Зубрихина Г.Н., Блиндарь В.Н., Сытов А.В. Окислительный стресс и эндогенная интоксикация у онкологических больных. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (7): 401-406.
DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-401-406>

Dobrovolskaya M.M., Zubrikhina G.N., Blindar V.N., Sytov A.V.

OXIDATIVE STRESS AND ENDOGENOUS INTOXICATION IN CANCER PATIENTS

Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Oncology N.N.Blokhin", under the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russian Federation

In the blood serum of 93 patients with various localities of the malignant process, the content of nitric oxide (NO), indicators of lipid peroxidation (POL): superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione in red blood cells were determined. 9 patients with ovarian cancer were examined during chemotherapy (6 courses), 40 patients with colon cancer, previously operated, were with malignant liver damage. In 39 patients with anemia, NO indicators were compared with the level of interleukin 6 (IL-6) and hepcidin-25 (GP-25). As a control, 60 practically healthy individuals were examined. It was shown that the NO content was significantly reduced in 69.7% of patients, regardless of the location of the primary tumor. There was a gradual increase in the NO content before each course of chemotherapy. A high concentration of NO (more than 22 μ M) was detected in 22 patients with functional iron deficiency (FJ) against the background of anemia of chronic diseases (AHZ), which was accompanied by hyperexpression of IL-6 (27.0 ± 10.5 pg/ml) and GP-25 (25.2 ± 7.1 ng/ml). In contrast, the lowest NO values (less than 22 μ M) were observed in 17 patients with IDA. There is no doubt that there is a certain relationship between the development of oxidative stress with the accumulation of highly toxic lipoperoxidation products that affect the overall homeostasis of the body, and the development of anemic syndrome.

Key words: cancer patients; lipid peroxidation; nitric oxide; oxidative stress; chemotherapy; anemia; nitric oxide.

For citation. Dobrovolskaya M.M., Zubrikhina G.N., Blindar V.N., Sytov A.V. Oxidative stress and endogenous intoxication in cancer patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (7): 401-406 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-401-406>

For correspondence: Dobrovolskaya Marina Mikhailovna, candidate of biological science, researcher; e-mail marina.dobrovolskaya.1975@mail.ru

Information about authors:

Dobrovolskaya M.M., <https://orcid.org/0000-0002-8889-5384>;
Zubrikhina G.N., <https://orcid.org/0000-0002-5854-9755>;
Blindar V.N., <https://orcid.org/0000-0002-4630-4988>;
Sytov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-6426-3200>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support

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

Received 31.03.2021
Accepted 15.04.2021

В последние годы широко обсуждается патогенетическая роль свободных радикалов кислорода в инициируемых ими процессов перекисного окисления

липидов (ПОЛ) и развитие тяжёлых заболеваний, в том числе онкологических. Окислительно-восстановительные процессы во многом определяют стабиль-

Для корреспонденции: Добровольская Марина Михайловна, канд.биол. наук, науч.сотр.; e-mail: marina.dobrovolskaya.1975@mail.ru

ность гомеостаза организма. В физиологических условиях ПОЛ протекает на крайне низком уровне, что предохраняет организм от накопления токсических продуктов. В результате нарушения этой системы накапливаются токсичные продукты, что сопровождается активацией деструктивных процессов, приводящих к окислительному стрессу. Он возникает в результате нарушения баланса в системе образования свободных радикалов и механизмов антиоксидантной защиты [1-6].

Установлено, что в регуляции свободно-радикальных реакций существенная роль принадлежит оксиду азота (NO). В норме NO осуществляет регуляцию внутри- и межклеточных процессов, участвует в различных биохимических процессах, протекающих в нервной, иммунной, сердечно-сосудистой и других системах [7-10]. NO регулирует тонус кровеносных сосудов, вызывает расслабление гладких мышц, что придаёт этой молекуле особую роль при развитии патологии. Высокая реакционная способность NO обусловлена наличием на его орбите неспаренного электрона ($N=O$). Поскольку молекула NO содержит неспаренный электрон, т.е. является свободным радикалом, она легко реагирует с другими соединениями, имеющими свободный радикал. Обеспечивая необходимый процесс в жизнедеятельности нормальной клетки, NO в то же время является потенциально токсичным при взаимодействии с супероксидным анионом, образуя токсичный пероксинитрит ($ONOO^-$), который может продуцировать высокореакционные гидроксильные радикалы, способствуя развитию окислительного стресса, приводя к разрушению целостности клеточных мембран [11-13]. Одним из часто встречающихся ранних симптомов эндогенной интоксикации организма при опухолевой патологии являются нарушения в системе кроветворения, в частности гемостаза. Поэтому было интересно посмотреть на показатели ПОЛ не только в сыворотке крови, но и в тромбоцитах.

Материал и методы. Всего обследованы 60 практически здоровых людей в возрасте 25-60 лет и 93 онкологических больных с различной локализацией злокачественного процесса (рак желудка – 27, толстая кишка – 26, яичники – 24, шейка матки – 10, молочная железа – 6), а также 40 больных со злокачественным поражением печени, ранее оперированных по поводу рака толстой кишки. 9 из 24 больных раком яичников с различными стадиями процесса, которым была произведена операция, были обследованы на фоне последующей химиотерапии. Кровь исследовали при первичном поступлении, на 10-й день после операции (перед 1-м курсом), а также в процессе 6 курсов химиотерапии до и на 3-й день после каждого курса.

Общее содержание нитрита/нитрата (NO_x) в сыворотке крови определяли при помощи реактива Грисса после восстановления нитрата до нитрита гранулами кадмия в присутствии цинка и измеряли при длине волны 546 нм [7]. Результаты выражали в микромолях на 1 л сыворотки. Метод определения содержания

NO_x при помощи реактива Грисса относительно простой, хорошо воспроизводимый и наиболее приемлемый как в научных, так и в клинических исследованиях. При этом следует иметь в виду, что реактив Грисса не позволяет определять концентрацию нитрат-иона, поэтому предварительно необходимо восстановить нитрат до нитрита. Для этого в качестве восстановителя используют фермент нитрат-редуктазу, либо гранулированный кадмий или ванадий [9]. Концентрацию нитрита регистрируют по азо-красителю, образующемуся в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса. В данной работе при исследовании суммарного содержания метаболитов оксида азота в параллельных опытах были использованы в качестве восстановителя нитрат-редуктаза и гранулированный кадмий. Оба метода хорошо воспроизводимы, полученные результаты практически полностью сопоставимы и не зависят от применённого восстановителя. Содержание супероксиддисмутазы – Cu/ZnSOD – (СОД) определяли с помощью тест-наборов для иммуноферментного анализа, который основан на фотометрии ферментного комплекса, образованного при связывании молекул СОД с пероксидазным конъюгатом моноклональных антител [14]. Интенсивность окраски измеряли при длине волны 450 нм микропланшетным методом на аппарате Multiskan Spectrum Microplate Spectrophotometer (Финляндия) и результаты выражали в нг/мл.

У 9 больных раком яичников, исследуемых на фоне химиотерапии, содержание СОД определяли в лизированных тромбоцитах при помощи глюкозо-солевого раствора и измеряли на спектрофотометре при 560 нм в системе ксантин-ксантиноксидаза. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало 50% торможение реакции на мг белка тромбоцитов. Содержание белка определяли при помощи красителя Кумасси бриллиантового синего G250.

Степень эндогенной интоксикации оценивали по содержанию в сыворотке крови малонового диальдегида (МДА) и глутатиона в эритроцитах. Метод определения содержания МДА основан на образовании окрашенного триметинового комплекса, содержащего одну молекулу МДА и две молекулы тиобарбитуровой кислоты [15], и измерении его содержания при длине волны 532 нм на спектрофотометре «Beckman DU-650». Результаты представляли в мкмоль/мл сыворотки.

Содержание глутатиона определяли в эритроцитах по реакции с ДТНБ (5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) после 20-минутной инкубации в присутствии глутатионредуктазы и NADPH и измеряли при длине волны 412 нм. Результаты выражали в микромолях на 1 мл эритроцитов [16, 17].

В плазме крови методом иммуноферментного анализа определяли содержание ферритина (ФР) с помощью наборов фирмы «Orgentec Diagnostica GmbH» (Германия), гепсидина 25 (ГП-25) с наборами «Peninsula Laboratories International, Inc.» (США) и интерлейкин-6 (ИЛ-6)-с помощью наборов Bender MedSystem (Австрия).

Статистический анализ полученных данных выполняли при помощи программы «Статистика 6» непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах – U-критерия Манна-Уитни. Корреляционный анализ производили методом Спирмена.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования показали, что в сыворотке крови практически здоровых, как мужчин, так и женщин, содержание NOx колебалось от 13,6 до 63,6 мкмоль/л и составило в среднем $27,8 \pm 0,8$ мкмоль/л, что полностью сопоставимо с данными других авторов, определявших уровень метаболитов оксида азота при помощи реактива Грисса [7-9]. Одновременно установлено, что содержание NOx у большинства обследованных онкологических больных (69,7%) было достоверно ниже по сравнению с нормой, независимо от локализации первичной опухоли ($p < 0,001$). При сравнительном анализе оказалось, что наиболее существенное снижение содержания NOx (на 36,3% ниже нормы) отмечалось у больных раком яичников ($17,9 \pm 1,3$ мкмоль/л). Причина этого может заключаться в агрессивном течении данного заболевания, раннем метастазировании и глубоких нарушениях метаболических процессов в организме. Это может быть связано также с интенсификацией сопряжённой реакции NO и супероксид аниона, в результате которой содержание NO может уменьшаться (табл. 1).

Вместе с тем следует обратить особое внимание на результаты обследования группы ранее оперированных больных с обширным злокачественным поражением печени и явлениями печёночной недостаточности, для которых характерным оказалось значительное повышение содержания NOx (на 25-30%) по сравнению с нормой и составило $35,6 \pm 1,2$ мкмоль/л. Повышенное содержания NOx, возможно, определяет метаболические и функциональные нарушения в клетках печени. Известно, что печень, занимающая центральное место во многих метаболических и иммунных процессах, является одним из основных органов, клетки которого активно генерируют NO при различных патологических состояниях, и инициация окислительного стресса является ведущим механизмом развития печёночной недостаточности.

Главной и начальной преградой на пути образования активных форм кислорода (АФК) является супероксиддисмутаза (СОД). СОД катализирует реакцию дисмутации, т. е. взаимодействие двух супероксидных радикалов (O_2^-) друг с другом, превращая токсичный супероксидный радикал в менее токсичную перекись водорода. Снижение активности СОД способствует избытку продукции супероксида, который в этих условиях взаимодействует с NO, образуя крайне токсичный пероксинитрит.

Реакция дисмутации, катализируемая СОД, является ключевой в регуляции скорости всего цикла превращения супероксидного аниона в другие активные формы кислорода и контролирует тем самым скорость свободно-радикального окисления. У онкологических больных этот показатель оказался у большинства повышен, особенно у больных с метастазами в печени, у которых он оказался выше нормальных значений более, чем в 2 раза ($105,0 \pm 2,6$ нг/мл) по сравнению с показателями здоровых ($59,0 \pm 0,7$ нг/мл).

Многочисленные данные указывают на то, что накопление токсических продуктов перекисидации приводит к повышению содержания МДА – промежуточного продукта свободно-радикального окисления, а выявленные корреляции между степенью интоксикации организма и повышением содержания МДА позволило назвать МДА маркером повреждения тканей. По нашим данным, у 75% больных, независимо от локализации первичной опухоли, уровень МДА был в 1,5 – 1,8 раза выше, чем в норме (см. табл. 1). Более того при сравнительном анализе оказалось, что понижение содержания NO сопровождается повышением уровня МДА ($r = -0,58, p < 0,05$), что свидетельствует о накоплении токсичных продуктов перекисидации и повышении степени интоксикации организма. Одной из причин понижения уровня NO может быть образование токсичного пероксинитрита в результате сопряженной реакции NO и супероксида. При этом могут возникать серьезные нарушения в детоксикационной системе организма онкологического больного.

Особый интерес для оценки степени эндотоксикоза вызывают исследования показателей системы глутатиона. Участвуя в обезвреживании перекисей и гидроксильных радикалов, глутатион непосредственно влияет на развитие окислительного стресса, вы-

Таблица 1

Содержание NO, эндогенная интоксикация у здоровых и больных со злокачественными новообразованиями ($X \pm m$)

Показатели	Практически здоровые, $n=60$	Онкологические больные до лечения, $n=93$	Рак яичников, $n=24$	Рак шейки матки, $n=10$	Рак толстой кишки, $n=26$	Рак желудка, $n=27$	Рак молочной железы, $n=6$	Метастазы рака толстой кишки в печени, $n=40$
NO, мкмоль/л	$27,8 \pm 0,8$	$22,1 \pm 1,1^*$	$17,9 \pm 1,3^*$	$20,5 \pm 1,7^*$	$21,2 \pm 1,4^*$	$22,4 \pm 1,3^*$	$22,3 \pm 1,2^*$	$35,6 \pm 1,2^*$
СОД, нг/мл	$59,0 \pm 0,7$	$68,1 \pm 2,5^*$	$75,1 \pm 1,8^*$	$63,2 \pm 2,3$	$72,3 \pm 2,8^*$	$69,1 \pm 2,5$	$63,9 \pm 3,1$	$105,6 \pm 2,6^*$
МДА, мкмоль/мл	$4,28 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,2^*$	$6,8 \pm 0,5^*$	$4,5 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,2^*$	$5,9 \pm 0,2^*$	$5,1 \pm 0,5^*$	$6,5 \pm 0,4^*$
Глутатион, мкмоль/мл эритроцитов	$1,19 \pm 0,07$	$1,67 \pm 0,07$	$1,69 \pm 0,08^*$	$1,66 \pm 0,1^*$	$1,86 \pm 0,7^*$	$1,79 \pm 0,07^*$	$1,4 \pm 0,1$	$0,98 \pm 0,05^*$

Примечание. * – $p < 0,001$ по сравнению с показателями здоровых; n – число больных.

ступая эффективной ловушкой свободных радикалов. Имеются сведения, что глутатион, взаимодействуя с глутатион-S-трансферазой, играет важную роль в детоксикации ксенобиотиков. В эритроцитах здоровых людей содержание глутатиона колебалось от 0,94 до 1,31 мкмоль/мл эритроцитов и составило в среднем $1,19 \pm 0,07$ мкмоль/мл эритроцитов. У первично обследованных онкологических больных независимо от локализации злокачественного процесса уровень глутатиона был на 40% выше нормы. Наиболее высокий уровень глутатиона наблюдался у больных раком желудка и раком толстой кишки (см. табл. 1).

По данным литературы, высокий уровень глутатиона характерен для онкологических больных, устойчивых к лечению химиопрепаратами. Эти данные подтверждают, что определение содержания глутатиона в сочетании с оценкой активности глутатион-S-трансферазы может не только иметь прогностическое значение при химиотерапии онкологических больных, но и свидетельствовать о существенной роли антипероксидной системы глутатиона в процессах детоксикации.

В то же время исследование содержания глутатиона у больных с метастазами в печени выявило четкое снижение ($p < 0,001$) содержания глутатиона. Глутатион является субстратом для группы, так называемых, глутатион-зависимых ферментов, тесно взаимодействующих между собой и осуществляющих каждый свою функцию. Изменение концентрации глутатиона отражается на их активности и сопровождается активацией липидной пероксидации. Поскольку основная функция этой группы заключается в инактивации пероксидов, очевидно, что дефицит глутатиона и глутатион-зависимых ферментов отражает глубину угнетения процессов ПОЛ у больных с метастатическим поражением печени. Причина этого может содержаться в агрессивном течении заболевания при метастазировании процесса и, в связи с этим, глубоких нарушениях метаболических процессов в организме. Кроме того, эти явления, по-видимому, отражают изменения, связанные с развитием воспалительных процессов в гепатоцитах. У этих больных повышение содержания СОД всегда сочеталось с высоким содержанием NO, являющимся маркером воспаления.

У 9 больных раком яичников проведено исследование ПОЛ на фоне химиотерапии. Исследование содержания NO в сыворотке крови больных первичным раком яичников до начала химиотерапии выявило снижение его содержания у всех обследованных больных. В среднем содержание NO составило $19,6 \pm 1,4$ мкмоль/л, что на 29,5% ниже по сравнению показателями здоровых людей. Через 10 дней после удаления опухоли (перед 1-м курсом химиотерапии) содержание NO оказалось повышенным на 12-14% по сравнению с данными до лечения и составило в среднем $22,9 \pm 0,9$ мкмоль/л ($p < 0,001$). Одновременно было отмечено повышение активности СОД (на 33%). Содержание МДА при этом не изменялось по сравнению с данными до лечения (табл. 2).

Однако через 3 дня после первого курса химиотерапии наблюдалось снижение содержания NO на 10-13% с одновременным повышением активности СОД в среднем на 10%. Содержание МДА практически оставалось на прежнем уровне. Необходимо отметить, что аналогичная картина наблюдалась при всех последующих курсах химиотерапии и заключалась в повышении содержания NO перед каждым курсом химиотерапии и снижением его содержания через 3 дня после введения препаратов. В то же время при анализе результатов исследования активности СОД и содержания МДА в процессе химиотерапии была выявлена иная динамика. Отмечено постепенное повышение активности фермента как до, так и через 3 дня после введения. Эта закономерность была установлена при всех последующих курсах лечения и имеет, по-видимому, принципиальное значение, поскольку при этом могут быть задействованы конкурентные взаимоотношения СОД и NO за супероксид радикал. Относительно содержания МДА не выявлено изменений по сравнению с данными до лечения. Выявлена достоверная взаимозависимость между активностью СОД и содержанием NO ($r = 0,63$, $p = 0,039$).

Особо важным результатом исследования явились данные о постепенном повышении содержания NO, определяемого перед каждым курсом лечения, что привело в конце лечения к почти двукратному его увеличению по сравнению данными до лечения. При высокой активности СОД снижается количество O_2^- , при этом тормозится реакция $NO + O_2^-$ и образование перок-

Таблица 2

Показатели крови у больных раком яичников в процессе химиотерапии ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Практически здоровые, $n=60$	Рак яичников ($n=9$)							
		До лечения	До и после курса ХТ	I курс	II курс	III курс	IV курс	V курс	VI курс
NO, мкмоль/л	$27,8 \pm 0,8$	$19,6 \pm 1,4^*$	перед после	$22,9 \pm 0,9^*$ $19,9 \pm 0,7^*$	$26,9 \pm 0,8$ $22,4 \pm 0,6^*$	$37,5 \pm 0,9^*$ $34,3 \pm 0,7^*$	$38,1 \pm 0,9^*$ $34,6 \pm 1,0^*$	$36,0 \pm 1,0^*$ $34,3 \pm 0,9^*$	$35,3 \pm 1,1^*$ $30,5 \pm 1,1^*$
СОД, нг/мл белка тромбоцитов	$27,5 \pm 1,3$	$32, \pm 1,5^*$	перед после	$42,8 \pm 1,7^*$ $45,0 \pm 1,5^*$	$48,7 \pm 1,6^*$ $56,1 \pm 1,1^*$	$58,7 \pm 0,9^*$ $70,2 \pm 1,7^*$	$64,8 \pm 1,5^*$ $70,2 \pm 1,7^*$	$78,3 \pm 1,2^*$ $80,3 \pm 1,2^*$	$75,0 \pm 1,3^*$ $78,6 \pm 1,2^*$
МДА, мкмоль/мл	$4,28 \pm 0,1$	$4,96 \pm 0,2^*$	перед после	$4,96 \pm 0,2^*$ $5,1 \pm 0,4^*$	$4,9 \pm 0,3^*$ $4,9 \pm 0,3^*$	$4,3 \pm 0,3$ $5,1 \pm 0,4^*$	$4,8 \pm 0,2^*$ $4,9 \pm 0,2^*$	$5,1 \pm 0,4^*$ $3,9 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,2$ $5,0 \pm 0,3^*$

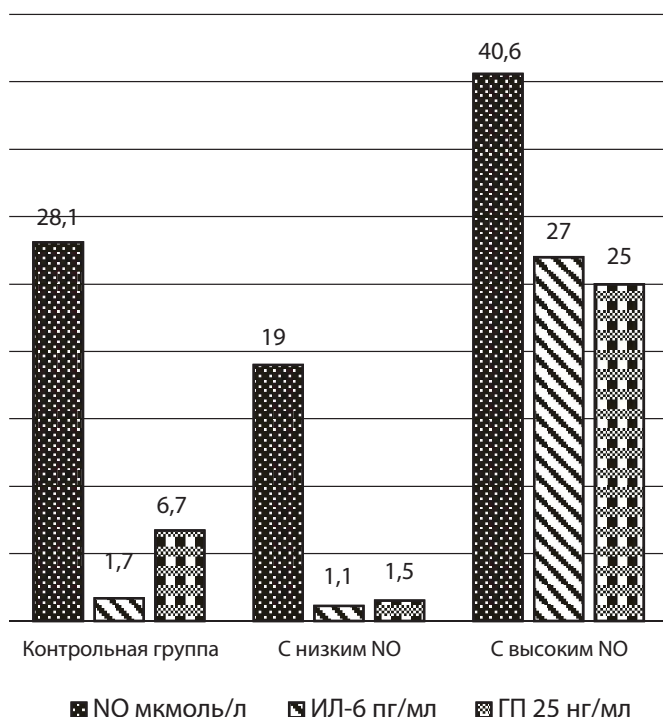
Примечание. * – показатели в процессе химиотерапии по сравнению со здоровыми, статистически значимы.

Таблица 3

Содержание интерлейкина 6, гепсидина-25 и других показателей феррокинетики в группах онкологических больных с анемией с низким (менее 22 мкмоль/л) и высоким содержанием (более 22 мкмоль/л) NO ($X \pm m$)

Показатели	ИЛ-6 пг/мл	ГП-25 нг/мл	ФР нг/мл	HGB г/л	MCV фл	MCH пг
Группа с низким содержанием NO ($n=17$)	$1,1 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,4$	$13,2 \pm 3,7$	$99,3 \pm 3,2$	$76,4 \pm 1,2$	$22,5 \pm 0,9$
Диапазон	0-4,1	0-1,7	4,7-18,8	70,0-118,0	67,0-80,2	15,3-25,1
Группа с высоким содержанием NO ($n=22$)	$27,0 \pm 10,5^*$	$25,2 \pm 7,1^*$	$539,6 \pm 122,4^{**}$	$97 \pm 4,0$	$74,6 \pm 1,8$	$23,5 \pm 0,7$
Диапазон	8,5-52,4	4,9-100,0	38,8-1596,4	66,0-115,0	66,2-88,1	17,1-24,3

Примечание. * – показатели ИЛ-6 и ГП-25 по сравнению с больными с низким содержанием NO, статистически значимы.



Показатели ИЛ-6, ГП-25 у онкологических больных с низким и высоким содержанием NO.

синитрита. Отсюда следует, что образование пероксинитрита может явиться тем ключевым моментом, в котором отражаются нарушения одновременно двух процессов – синтеза NO и ферментативной активности СОД. Следует ещё раз подчеркнуть, что NO – потенциально токсическое вещество и его избыток так же, как и дефицит, неблагоприятен для организма. Принимая во внимание участие СОД в первой линии защиты окислительного стресса в большей степени вероятности можно предположить, что именно повышение активности СОД у онкологических больных при интенсивной химиотерапии приводит, в конечном счёте к повышению NO, который, в данном случае, обнаруживает не регуляторное, а цитостатическое/цитотоксическое действие, приводящее к различным патологическими проявлениями. Взаимодействие NO с активными формами кислорода и инициация при этом окислительного стресса во многом определяет токсические эффекты NO.

Учитывая важную роль NO в развитии окислительного стресса и эндогенной интоксикации при опухолевой патологии, необходимо было рассмотреть возможность взаимоотношений в системе кроветворения и активности ПОЛ. Известно, что у онкологических больных, независимо от локализации опухоли, обнаруживаются признаки анемии, чаще это анемия хронических заболеваний (АХЗ). В патогенезе данной формы анемии главную роль играет взаимодействие NO и ИЛ-6. ИЛ-6, воздействуя на костномозговое кроветворение, способствует выработке гепсидина. Установлено, что гиперпродукция интерлейкина-6 способствует повышенному синтезу ГП-25. Циркулируя в плазме, ГП-25 взаимодействует с транспортным белком ферропортином, подавляет всасывание железа в кишечнике, высвобождение его из макрофагов, что приводит к дефициту железа в костном мозге и развитию анемии [18-20]. При том, что количество железа в организме может быть достаточным и даже повышенным, возникает так называемый функциональный дефицит железа.

Было проведено исследований показателей крови и уровня NO у 39 обследованных больных с анемией. По содержанию NO больные были подразделены на 2 группы: с высоким и низким содержанием NO. Оказалось, что у большинства больных с низким содержанием NO (менее 22 мкмоль/л) концентрация гемоглобина составила $99,3 \pm 3,2$ г/л, отмечался микроцитоз ($MCV=76,4 \pm 1,2$ фл) и гипохромия ($MCH=22,5 \pm 0,9$ пг) эритроцитов. Содержание ферритина (ФР) было снижено ($13,2 \pm 3,7$ нг/мл) по сравнению нормальными показателями ($97,9 \pm 15,8$ нг/мл), что свидетельствовало об истинной железодефицитной анемии. Содержание ИЛ-6 составило $1,1 \pm 0,4$ пг/мл с колебаниями от 0 до 4,1 пг/мл, ГП-25 был значительно ниже нормы ($1,5 \pm 0,4$ нг/мл). Вторая группа ($n=22$), с высоким содержанием NO, была отнесена к группе больных с АХЗ и функциональным дефицитом железа, которая характеризовалась высокой концентрацией ФР ($539,6 \pm 122,4$ нг/мл). ГП-25 составил $25,2 \pm 7,1$ нг/мл и ИЛ-6 – $27,0 \pm 10,5$ пг/мл, что достоверно выше, чем у больных с ЖДА (табл. 3, см. рисунок).

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать заключение, что содержание NO и обмен железа в организме два взаимосвязанных процесса. Цитокины, вырабатываемые под влиянием

янием нарушения восстановительно-окислительных процессов, в частности NO, подавляют процесс дифференцировки клеток-предшественников эритроидного ряда, что приводит к укорочению жизни эритроцитов со 120 до 60–90 дней и ограничивают доступное использование железа даже при его достаточном содержании в организме. В результате развивается функциональный дефицит железа, т.е. важным патогенетическим фактором в развитии АХЗ является нарушенная мобилизация железа из депо. Не вызывает сомнений, что существует определённая взаимосвязь между развитием окислительного стресса с накоплением высокотоксичных продуктов липопероксидации, влияющих на общий гомеостаз организма, и развитием анемического синдрома.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 12, 14–20 см. REFERENCES)

1. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. М.: Наука; 2001.
2. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: Изд-во «АРТА»; 2008.
3. Горожанская Э.Г., Зубрихина Г.Н., Свиридова С.П. Свободнорадикальное окисление и основные механизмы антиоксидантной защиты в норме и при злокачественной патологии: Учебное пособие для врачей. М.: ГОУ МГ ФСО; 2010.
4. Соадаева С.К. Свободнорадикальные механизмы повреждения при болезни органов дыхания. *Пульмонология*. 2012; 1: 5–10.
5. Герасименко М.Н., Титова Н.М., Зуков Р.А. Перекисное окисление липидов и состояние антиоксидантной системы в эритроцитах больных раком почки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 12: 692–4.
6. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс: прооксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма «Слово»; 2006.
7. Голиков П.П., Николаева Н.Ю. Метод определения нитрита/нитрата (NO_x) в сыворотке крови. *Биомедицинская химия*. 2004; 50(1):79–85.
8. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях. *Вестник РАМН*. 2000; 4: 3–5.
9. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2005; 6: 15–8.
10. Марков Х.М. Оксид азота и ишемическая болезнь сердца. *Вестник РАМН*. 2009; 92: 40–4.
11. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патологические свойства *Терапевтический архив*. 2005; 1: 82–7.
13. Стародубцева М.Н. Пероксинитрит в физиологии и патологии клеток крови. М.: ЛИБРИКОМ; 2011.
20. Нестерова Ю.А., Зубрихина Г.Н., Блиндарь В.Н., Матвеева И.И. Интерлейкин-6 в диагностике железодефицитного состояния у онкологических больных. *Медицинский алфавит*. 2017; 26 (323): 46–7.
1. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Menshchikova E.B., Oxidative stress. Biochemical and pathophysiological aspects. Moscow: Nauka; 2001. (in Russian)
2. Menshchikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z. Oxidative stress. Pathological conditions and diseases. Novosibirsk: ARTA; 2008. (in Russian)
3. Gorozhanskaya E.G., Zubrikhina G.N., Sviridova S.P. Free radical oxidation and the main mechanisms of antioxidant protection in normal and malignant pathology. [Uchebnoe posobie dlya vrachey]. Moscow: GOU MG FSO; 2010. (in Russian)
4. Soadaeva S.K. Free radical damage mechanisms in respiratory diseases. *Pul'monologiya*. 2012; 1: 5–10. (in Russian)
5. Gerasimenko M.N., Titova N.M., Zukov R.A. Lipid peroxidation and the state of the antioxidant system in red blood cells of patients with kidney cancer. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2012; 2: 692–4. (in Russian)
6. Menshchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K., Bondar I.A., Krugovykh N.F., Trufakin V.A. Oxidative stress: prooxidants and antioxidants. Moscow: Fima "Slovo"; 2006. (in Russian)
7. Golikov P.P., Nikolaev N.Yu. Method for determination of nitrite / nitrate (NO_x) in blood serum. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2004; 50 (1):79–85. (in Russian)
8. Vanin A.F. Nitric oxide in biomedical research. *Vestnik RAMN*. 2000; 4:3–5. (in Russian)
9. Metelskaya V.A., Gumanova N.G. Screening method for determining the level of nitric oxide metabolites in serum. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2005; 6: 15–8. (in Russian)
10. Markov H.M. Nitric oxide and coronary heart disease. *Vestnik RAMN*. 2009; 92: 40–4. (in Russian)
11. Pokrovsky V.I., Vinogradov N.A. Nitric oxide, its physiological and pathological properties. *Terapevicheskiy Arkhiv*. 2005; 1: 82–7. (in Russian)
12. Martin R.D., Eleanor K.C., John W.M. et all. Oxidative damage to extra cellular matrix and its role in human pathologies. *Biology Medicine*. 2008; 44: 1973–2001.
13. Starodubtseva M.N. Peroxynitrite in the physiology and pathology of blood cells. Moscow: LIBRICOM; 2011. (in Russian)
14. Porstmann T., Wietschke R., Schmechta H., Grunow R., Porstmann B., Bleiber R., Pergande M., Stachet S., von Baehr R. A rapid and sensitive enzyme for Cu/Zn superoxide dismutase with polyclonal and monoclonal antibodies. *Clin. Chim. Acta*. 1998; 171: 1–10.
15. Uchiyama M., Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Bioch.* 1978; 86 (1): 271–8.
16. Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacotherapy*. 2003; 57(3, 4): 145–55.
17. Galano A., Alvarez-Idaboy J.R. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defence action against free radicals. *RSC Advances*. 2011; 9 (1): 1763–71.
18. Ganz T., Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev. Med* 2011; 62: 347–60.
19. Coyne D. Hepcidin; clinical utility as a diagnostic tool and the therapeutic target. *Kidney Int*. 2011; 3(80): 240–9.
20. Nesterova Yu.A., Zubrikhina G.N., Blindar V.N., Matveeva I.I. Interleukin-6 in the diagnosis of iron deficiency in cancer patients. *Medit-sinskiy alfavit*. 2017; 26 (323): 46–7. (in Russian)

Поступила 31.03.21
Принята к печати 15.04.21

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Янушевич О.О., Духовская Н.Е., Вавилова Т.П., Островский Ю.А., Курбанова З.Т., Островская Ю.А.

СЛЮНА КАК НОВЫЙ АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ D-ДИМЕРА

ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ, 127473, Москва, Россия

Исследовано количество D-димера в смешанной слюне здоровых лиц и пациентов с сопутствующими заболеваниями. Установлено, что уровень D-димера в слюне увеличивается с возрастом не зависимо от патологии. Самые высокие значения обнаружены у пациентов с эрозивным гастритом.

Ключевые слова: D-димер; слюна; сопутствующие заболевания.

Для цитирования: Янушевич О.О., Духовская Н.Е., Вавилова Т.П., Островский Ю.А., Курбанова З.Т., Островская Ю.А. Слюна как новый аналитический объект для определения уровня D-димера. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (7): 407-410. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-407-410>

Yanushevich O.O., Dukhovskaya N.E., Vavilova T.P., Ostrovskiy Y.A., Kurbanova Z.T., Ostrovskaya Yu.A.

SALIVA AS NEW ANALYTICAL OBJECT FOR D-DIMER LEVEL DETERMINATION

A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 127473, Russia

The amount of D-dimer in the mixed saliva of healthy individuals and patients with comorbidities has been investigated. It has been established that the level of D-dimer in saliva increases with age regardless of pathology. The highest values were found in patients with erosive gastritis.

Key words: D-dimer; saliva; comorbidities.

For citation: Yanushevich O.O., Dukhovskaya N.E., Vavilova T.P., Ostrovskiy Y.A., Kurbanova Z.T., Ostrovskaya Yu.A. Saliva as new analytical object for D-dimer level determination. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (7): 407-410 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-407-410>

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

Information about authors:

Yanushevich O.O., <https://orcid.org/0000-0002-4293-8465>;
Dukhovskaya N.E., <https://orcid.org/0000-0003-0533-7051>;
Vavilova T.P., <https://orcid.org/0000-0002-4255-8825>;
Ostrovskiy Y.A., <https://orcid.org/0000-0002-0096-3988>;
Kurbanova Z.T., <https://orcid.org/0000-0002-6959-8528>;
Ostrovskaya Yu.A., <https://orcid.org/0000-0002-4710-9172>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 16.03.2021
Accepted 22.04.2021

Введение. В настоящее время ведется поиск технологий, способствующих расширению объектов биохимического анализа. В диагностических целях в качестве биологического образца все шире используется смешанная слюна, обладающая преимуществом перед венепункцией простотой и безболезненностью получения, информативностью. Кроме того, существует гематосаливарный барьер, который не пропускает высокомолекулярные соединения, но не ограничивает проницаемость для избранных веществ, например, наркотиков.

D-димер – это крупный фрагмент, высвобождающийся при распаде фибринового сгустка в процессе фибринолиза [1]. Он стимулирует клетки моноцитарофагальной линии к секреции интерлейкина-1. Повышенные количества D-димера в плазме крови являются прямым признаком активации фибриноли-

тической системы и косвенным показателем образования тромба в организме, поскольку воспалительный процесс сопровождается образованием фибриновой пленки на поврежденном участке [2]. Поэтому, считается, что определение D-димера в плазме крови является простым, быстрым и точным диагностическим инструментом, позволяющим врачам-клиницистам оценивать фибринолитическую способность организма без применения дорогостоящего оборудования для визуализации [3, 4]. Получение слюны не является затратным и болезненным мероприятием, что особенно важно для геронтологических и педиатрических пациентов, и также не требует привлечения специалиста для сбора образца. В связи с вышеизложенным, методика сбора и обработки слюны является экономически целесообразной для проведения исследований.

Для корреспонденции: Духовская Наталья Евгеньевна, канд. мед. наук, доц. каф. пропедевтики стоматологических заболеваний; e-mail: ndukhovskay@mail.ru

Показано, что в полости рта источником фибрина могут являться малые слюнные железы и десневая жидкость [5,6]. Установлено, что последняя обладает фибринолитической активностью, так как в ней содержатся фибринолизин (плазмин), его профермент – плазминоген и активатор плазминогена [6]. M.S. Lanz и соавт. [7] выявили, что фибринолитическими свойствами в полости рта обладают *Porphyromonas gingivalis*, которые наиболее активны при воспалении пародонта. X. Zhang и соавт. [8] определили, что уровень D-димера в слюне человека превышает таковую в плазме крови в два раза. В связи с этим, вызывает интерес изучение количества D-димера в слюне с целью получения положительного предиктивного значения для диагностики системных и локальных заболеваний.

Цель: исследовать содержание D-димера в смешанной слюне пациентов с сопутствующими заболеваниями

Материал и методы. Сбор смешанной слюны осуществляли натошак, в утренние часы с 9.00 до 10.00, без стимуляции путем сплевывания в пластиковую мерную пробирку в течение 5 минут. Накануне, перед сбором слюны всем пациентам рекомендовалось не употреблять алкогольные напитки, и непосредственно перед ее забором не курить и не принимать лекарственные препараты. В образцах слюны определяли количество слюны и рассчитывали скорость слюноотделения в мл/мин, а также измеряли pH слюны портативным потенциометром «Hanna» («Hanna Instruments», Германия). Перед определением слюны тщательно перемешивали путем встряхивания на шейкере и методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли количество D-димера в нг/мл. Для определения D-димера использовали стандартный набор реактивов «Вектор Бест» (Россия). При оценке количества D-димера в слюне учитывался пол обследуемых, возраст, сопутствующие заболевания, состояние тканей ротовой полости, количество выделенной слюны и pH слюны, которые отражают состояние слюнных желез и наличие воспалительных процессов в ротовой полости.

Всего были обследованы 60 пациентов (26 мужчин и 34 женщины) с сопутствующими заболеваниями в возрасте от 21 до 90 лет (средний возраст $55,6 \pm 2,23$ года) и 15 волонтеров без системной патологии и с санированной полостью рта. Всем пациентам выдавалась памятка о проводимом исследовании и было подписано информированное согласие. Обследованные пациенты проходили лечение в амбулаторных или стационарных условиях по основному заболеванию. Диагноз устанавливался лечащим врачом общего профиля на основании визуального и инструментального обследования. Все пациенты в зависимости от состояния органов и тканей были разделены на 5 групп: с заболеванием желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), с патологией сердечно-сосудистой системы (ССС), с психотическими расстройствами (ПР), с патологией бронхолегочной системы (БЛС) и здоровые волонтеры (контрольная группа). Содержание D-димера в слюне было изучено не только по общесистемным заболева-

ниям, но и их нозологиям: гипертоническая болезнь (ГБ), ишемическая болезнь сердца (ИБС); параноидная шизофрения непрерывного типа течения (ПШНТ), параноидная шизофрения приступообразного типа течения (ПШПТ); атрофический гастрит (АГ), хронический гастрит (ХГ), грыжа пищеводного отверстия диафрагмы (ГПОД), эрозивный гастрит (ЭГ), катаральный колит (КК); хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), саркоидоз. Распределение числа обследованных представлено в табл. 1.

Результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента и метода корреляционного анализа по Спирмену. Достоверными считались значения при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования выявили значительную вариабельность количества D-димера в слюне у пациентов с сопутствующими заболеваниями, и эти колебания составили от 3,27 до 6161 нг/мл. В смешанной слюне здоровых волонтеров содержание D-димера в слюне не определялось.

На рис. 1 представлена гистограмма частоты распределения 60 значений количества D-димера в слюне пациентов с сопутствующими заболеваниями. На столбиках слева выявляется отрицательная асимметрия в диапазоне уровня до 1000 нг/мл и значительный провал от значений 2500 нг/мл, прерывающийся единичными показателями на уровне 3500 и 6000 нг/мл.

Статистические расчеты показали, что количество D-димера в слюне выше у лиц женского пола. При этом у женщин выявлялись самые минимальные и максимальные значения исследуемого показателя (табл. 2).

Изучение количества D-димера в слюне пациентов в зависимости от сопутствующей патологии показало, что наибольшие его значения выявлялись в группе пациентов с патологией ЖКТ, а самые низкие у пациентов с ПР по отношению к данным пациентов с другими сопутствующими заболеваниями. У паци-

Таблица 1
Распределение числа обследованных с сопутствующими заболеваниями

Группы/нозонологии	n
ЖКТ	28
АГ	5
ХГ	6
ГПОД	5
ЭГ	7
КК	5
ССС	15
ИБС	7
ГБ	8
ПР	8
ПШНТ	4
ПШПТ	4
БЛС	9
ХОБЛ	5
Саркоидоз	4
Контрольная группа	15

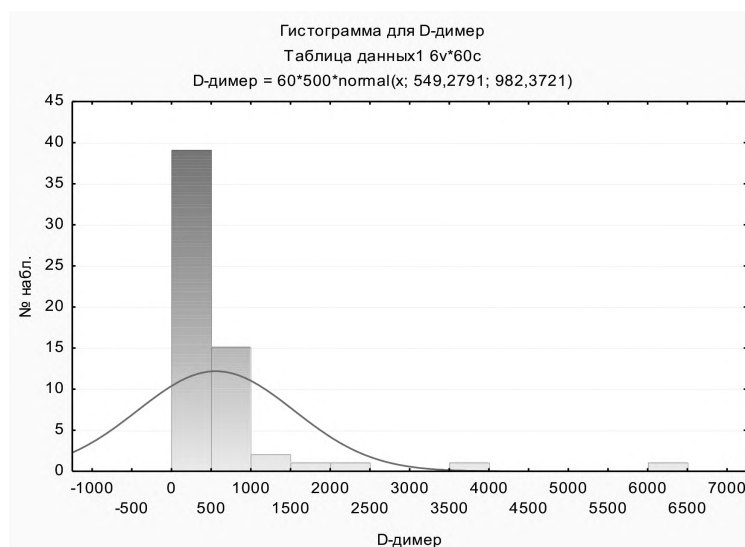


Рис. 1. Графическое изображение частотного распределения по интервалам количества D-димера в слюне.

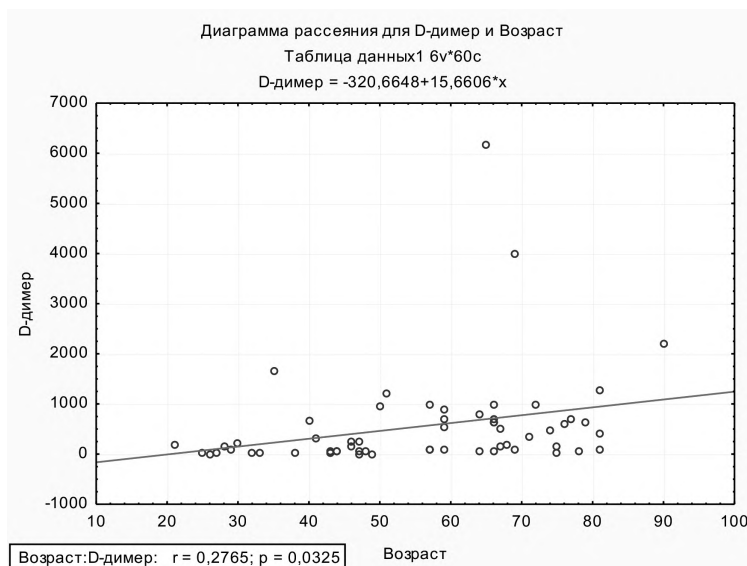


Рис. 2. График корреляционного анализа зависимости количества D-димера в слюне от возраста пациентов.

Таблица 2

Описательная статистика количества D-димера (нг/мл) в слюне пациентов с сопутствующей патологией

Показатели		n	M	min	max	m
Пол	Женщины	34	629	3,27	6161	211
	Мужчины	26	444	17,1	2211	101
Сопутствующие заболевания	ЖКТ	28	881	4,29	6161	253
	ССС	15	306	50,5	983	73,9
	ПР	8	159	3,27	965	116
	БЛС	9	270	6,91	682	94,5

ентов с заболеваниями ССС и БЛС значения уровня D-димера в слюне были практически одинаковыми.

Был проведен корреляционный анализ между уровнем D-димера в слюне, клиническими параметрами, скоростью слюноотделения, pH слюны, сопутствующими заболеваниями и полом пациентов. Результаты показали достоверную ($p < 0,05$) прямую

положительную взаимосвязь увеличения количества D-димера в слюне в зависимости от возраста (рис. 2). Самые низкие значения D-димера в слюне определялись у пациентов в возрасте от 20 до 30 лет, а самые высокие – у пациентов от 70 до 90 лет.

Наши исследования показали, что максимальное количество D-димера в слюне определялось у паци-

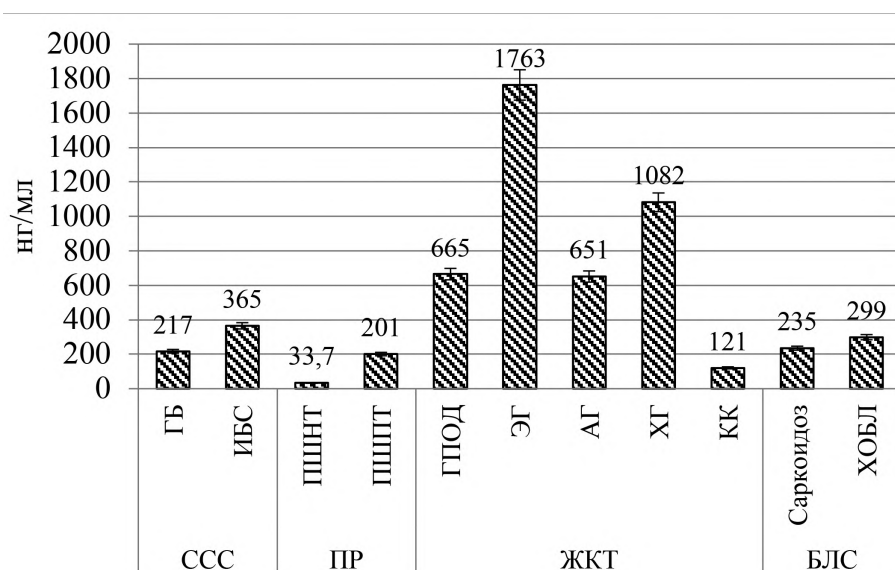


Рис. 3. Количество D-димера в слюне в зависимости от нозологии сопутствующего заболевания.

ентов с заболеваниями ЖКТ. Распределение в зависимости от нозологии заболевания ЖКТ показало, что наибольшее количество D-димера в слюне определялось у пациентов с эрозивным гастритом (1763 ± 234 нг/мл), средние значения при атрофическом гастрите ($651 \pm 72,0$ нг/мл) и ГПОД ($665 \pm 82,3$ нг/мл), а самое низкое содержание D-димера в слюне выявлялось при катаральном колите ($121 \pm 32,1$ нг/мл) (рис. 3).

Исследование количества D-димера в слюне у пациентов с нозологиями ССС показало, что эти значения значительно меньше, чем у пациентов с заболеваниями ЖКТ. У пациентов с ИБС количество D-димера в слюне было выше, чем при ГБ.

Очень важно определять количество D-димера не только при заболевании ССС и тромбообразовании, но и заболеваниях легких, которые в последнее время определяют в плазме крови пациентов с COVID-19. Однако, при определении D-димера в слюне у пациентов с легочной патологией не было выявлено существенных отличий между саркоидозом и ХОБЛ. При психотическом расстройстве непрерывного течения ($33,7 \pm 5,67$ нг/мл) количество D-димера в слюне было самым низким среди всех изученных нозологических форм.

Заключение. У здоровых людей количество D-димера в слюне не определяется, и выявляется у пациентов с соматическими заболеваниями. Установлено, что уровень D-димера в слюне увеличивается с возрастом и не зависит от вида патологии. Наибольшие значения D-димера в слюне были получены у пациентов с эрозивным гастритом, что является существенным диагностическим критерием.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-2, 4-9 см. REFERENCES)

- Дибиров М.Д., Вавилова Т.П., Минаев А.В. Исследование биохимических показателей в биоптатах стенок вен нижних конечностей при варикозной болезни. *Флебология*. 2019; 13(2): 141-5.

REFERENCES

- Bizzarro S., Nicu E.A., van der Velden U., Laine M.L., Loos B.G. Association of serum immunoglobulin G (IgG) levels against two periodontal pathogens and prothrombotic state: a clinical pilot study. *Thromb.* 2010; 8:16.
- Shorr A.F., Thomas S.J., Alkins S.A., Fitzpatrick T.M., Ling G.S. D-Dimer correlates with proinflammatory cytokine levels and outcomes in critically ill patients. *Chest*. 2002; 121:1262-8.
- Dibirov M.D., Vavilova T.P., Minaev A.V. Biochemical Examination of Varicose Veins Wall Specimens in Patients with Chronic Venous Disease. *Flebologiya*. 2019;13(2):141-5. (in Russian)
- Ibañez C., Perdomo J., Calvo A., Ferrando C., Reverter C.J., Tassies D., Blasi A. High D dimers and low global fibrinolysis coexist in COVID19 patients: what is going on in there? *Thromb. Thrombolysis*. 2020; 15:1-5.
- Zeher M., Szegedi G., Csiki Z., Cseh A., Adany R. Fibrinolysis-Resistant Fibrin Deposits in Minor Labial Salivary Glands of Patients with Sjögren's Syndrome. *Immunopathology*. 1994; 71(2):149-55.
- Toyman U., Tüter G., Kurtiş B., Kıvrak E., Bozkurt Ş., Yücel A.A., Serdar M. Evaluation of gingival crevicular fluid levels of tissue plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 2, matrix metalloproteinase-3 and interleukin 1-β in patients with different periodontal diseases. *Periodontal Res*. 2015; 50(1):44-51.
- Lantz M.S., Allen R.D., Bounelis P., Switalski L.M., Hook M. Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedius recognize different sites on human fibrinogen. *Bacteriol.* 1990; 172:716-26.
- Zhang X., Wan Y., Cooper-White J., Dimeski G., Atherton J., Punyadeera C. Quantification of D-dimer levels in human saliva. *Bioanalysis*. 2013; 5(18):2249-56.

Поступила 16.03.21
Принята к печати 22.04.21

КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Арипов А.Н.¹, Каюмов У.К.¹, Иноятлова Ф.Х.², Хидоятлова М.Р.¹

РОЛЬ ЛЁГКИХ В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹Ташкентский институт усовершенствования врачей Минздрава Узбекистана, 100007, Ташкент, Узбекистан;

²Ташкентская медицинская академия Минздрава Узбекистана, 100109, Ташкент, Узбекистан

В легочной ткани содержатся различные элементы системы гемостаза, которые могут освободиться из легких, как в физиологических, так и в патологических условиях. Пандемия COVID-19 привела к увеличению числа больных с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС). При повреждении лёгких нарушения коагуляции опосредуются путем тканевой фактора (ТФ) – фактора VIIa (F VIIa), и ингибирование этого пути полностью устраняет внутрилегочное отложение фибрина. Снижение активации ингибитора пути тканевого фактора (ИПТФ) также способствует легочной коагулопатии при ОРДС. Коагулопатия, вызванная воспалением легких, может усугубить повреждение легких и, таким образом, способствовать прогрессированию болезни. Цитокины являются основными связывающими факторами между воспалением и изменениями свертывания крови и фибринолизом. Источниками провоспалительных цитокинов в легких, вероятно являются альвеолярные макрофаги. Активация альвеолярных макрофагов происходит через ядерный фактор каппа-би (NF-κB), контролирующего этапы транскрипции экспрессии генов иммунного ответа, апоптоза клеток, что приводит к развитию воспаления и аутоиммунных заболеваний в результате прямой стимуляции экспрессии ТФ. И наоборот, коагуляция сама по себе может повлиять на бронхоальвеолярное воспаление. Коагуляция приводит к образованию протеаз, которые взаимодействуют со специфическими клеточными рецепторами, активируя внутриклеточные сигнальные пути. Применение антикоагулянтной терапии, имеющее также противовоспалительное действие, может быть одной из терапевтических мишеней при коронавирусной инфекции. Исходя из вышеизложенного, представляется целесообразным изучить влияние антикоагулянтных вмешательств на клинически значимые кардиореспираторные параметры.

Ключевые слова: обзор литературы; COVID-19; гемостаз; легкие.

Для цитирования: Арипов А.Н., Каюмов У.К., Иноятлова Ф.Х., Хидоятлова М.Р. Роль лёгких в системе гемостаза (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (7): 411-416. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-411-416>

Aripov A.N.¹, Kayumov U.K.¹, Inoyatova F.Kh.², Khidoyatova M.R.¹

ROLE OF LUNGS IN THE HEMOSTASIS SYSTEM (REVIEW OF LITERATURE)

¹Tashkent institute of postgraduate medical education;

²Tashkent Medical Academy

The lung tissue contains various hemostatic system elements, which can be released from the lungs, both under physiological and pathological conditions. The COVID-19 pandemic has led to an increase in the number of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) in intensive care units worldwide. When the lungs are damaged, coagulation disorders are mediated by tissue factor (TF) – factor VIIa (F VIIa), and inhibition of this pathway completely eliminates intrapulmonary fibrin deposition. A tissue factor pathway inhibitor TFPI also contributes to pulmonary coagulation disturbance in ARDS. Pulmonary coagulation disturbance caused by pneumonia can worsen the damage to the lungs and thus contribute to the progression of the disease. Cytokines are the main linking factors between inflammation and changes in blood clotting and fibrinolysis. The sources of proinflammatory cytokines in the lungs are probably alveolar macrophages. The activation of alveolar macrophages occurs through the nuclear factor kappa-bi (NF-κB), which controls the transcription of the expression of immune response genes, cell apoptosis, which leads to the development of inflammation and autoimmune diseases as a result of direct stimulation of TF activation. Conversely, coagulation itself can affect bronchoalveolar inflammation. Coagulation leads to the formation of proteases that interact with specific cellular receptors, activating intracellular signaling pathways. The use of anticoagulant therapy, which also has an anti-inflammatory effect, perhaps one of the therapeutic targets for coronavirus infection. The difficulty here is that it seems appropriate to study anticoagulant interventions' influence on clinically significant cardio-respiratory parameters.

Key words: review literature; COVID-19; hemostatic; lung tissue.

For citation: Aripov A.N., Kayumov U.K., Inoyatova F.Kh., Khidoyatova M.R. Role of lungs in the hemostasis system (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (7): 411-416 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-411-416>

For correspondence: Khidoyatova M.R., PhD, assistant of the department Functional Diagnostics; e-mail: khidoyatova.m@mail.ru

Information about authors:

Aripov A.N. <https://orcid.org/0000-0002-3074-6634>;

Kayumov U.K. <https://orcid.org/0000-0002-1611-3064>;

Inoyatova F.Kh., <https://orcid.org/0000-0003-1810-250X>;

Khidoyatova M.R. <https://orcid.org/0000-0001-6591-1268>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

The authors would like to thank by the vice-rector for science Tashkent institute of postgraduate medical education, Atakhanov Shukhrat for his great support.

Received 31.01.2021
Accepted 15.04.2021

В литературе появляется всё больше клинических наблюдений и научных исследований с различными данными об особенностях нарушений системы гемостаза при коронавирусной инфекции (COVID-19). В данном обзоре мы решили представить функцию лёгких в регуляции системы гемостаза, как основного органа поражения при COVID-19.

Одной из важнейшей нереспираторной функций легких является их участие в регуляции функционального состояния системы гемостаза [1]. Легочная ткань содержит разнообразные компоненты системы гемостаза, которые могут освобождаться из легких, как в физиологических, так и в патологических условиях [1,2]. Пандемия COVID-19 привела к увеличению числа пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС). Исследование поврежденного легкого при ОРДС демонстрирует повреждение эпителиальных клеток, представленное обширным некрозом пневмоцитов, набуханием эндотелиальных клеток с расширением межклеточных пространств и образованием гиалиновых мембран, состоящих из фибрина в альвеолярных протоках и воздушных пространствах. На более поздних стадиях происходит массивная инфильтрация нейтрофилов и других воспалительных клеток, и фибриновые тромбы можно будет увидеть в альвеолярных капиллярах и в более мелких легочных артериях [3]. Обильное присутствие внутрисосудистого и внесосудистого фибрина, по-видимому, является специфическим признаком ОРДС и является гораздо более сложным, чем отложение фибрина, связанное с тяжелым воспалением в других органах.

У больных с тяжелой пневмонией идет сдвиг альвеолярного гемостатического баланса. В бронхоальвеолярном содержимом обнаруживается заметно повышенная прокоагулянтная активность. Соответственно, фибринолитическая активность в бронхоальвеолярной жидкости (БАЖ) снижена, что связано с высокими концентрациями ингибиторов фибринолиза в легких [4-7]. Изменения альвеолярного гемостатического баланса более выражены при альвеолярной пневмонии, чем при бронхопневмонии. Однако степень гемостатических изменений при тяжелой пневмонии, требующей искусственной вентиляции легких, почти идентичны таковым при ОРДС [3].

Среди тканевых факторов наиболее заметная роль принадлежит тканевому фактору (ТФ), именуемому также – фактор III или тканевой тромбопластин. Им богаты различные ткани, в том числе легочная. Поэтому разрушение тканей также может приводить к развитию ДВС-синдрома [8], и активация образования альвеолярного тромбина при пневмонии усиливается под воздействием комплекса ТФ – фактор

свёртывания VII (ФVII)[6]. Во время инфицирования и взаимодействия микроорганизмов с компонентами защиты организма активация коагуляции в легких инициируется повышенным выбросом ТФ, который постоянно и в большом количестве присутствует в легких [9]. Во время легочной инфекции, которая, вероятно, опосредована провоспалительными цитокинами, такими как фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и интерлейкин-1 β (IL-1 β), наряду с популяциями основных клеток, как местные, так и инфильтрирующие макрофаги, становятся источниками ТФ [10]. Кроме того, эксперименты *in vitro* показывают, что «липополисахарид-стимулированные» легочные макрофаги могут экспрессировать другие факторы свертывания и фибриноген [11, 12]. ТФ-индуцированное образование тромбина плохо контролируется физиологическими антикоагулянтными механизмами в легких. Легкие только в очень ограниченной степени способны продуцировать протеин С, физиологический антикоагулянт, который активируется под действием тромбина, превращаясь в активированный протеин С, способный связываться с протеином S и расщеплять факторы коагуляции Va и VIIIa. Активированный протеин С (АПС) обладает также выраженной противовоспалительной и антиапоптозной активностью [13]. Однако способность вырабатывать АПС нарушается во время повреждения легких. Относительная недостаточность системы протеина С может быть вызвана повышенным потреблением и ускоренным расщеплением протеина С эластазой нейтрофилов [14].

Некоторые авторы указывают на то, что недостаточность протеина С в воспаленных легких связана с выбросом высокого уровня растворимого тромбомодулина [15]. Тромбомодулин, находясь на мембране эндотелиальных клеток, связывает молекулу тромбина из крови. При этом образовавшийся комплекс тысячекратно ускоряет активацию протеина С. Более того, связанный тромбин исключается из системы свертывания крови [15-17]. Аналогично, в норме в легких присутствуют относительно низкие концентрации антитромбина (АТ), но АТ быстро расходуется во время эндотоксемии, что приводит к резкому снижению его концентрации [18]. Экспериментальные модели продемонстрировали, что во время течения легочных инфекций эндогенный АТ значительно снижается в БАЖ [19,20].

Несмотря на усиление продукции бронхоальвеолярного фибрина, фибринолитическая активность снижена в БАЖ пациентов с пневмонией, что, по-видимому, связано с высокими концентрациями в легких PAI-1 (ингибитор активаторов плазминогена), основного ингибитора фибринолиза в легких [21]. Основная функция PAI-1 заключается в ин-

гибировании сериновых протеаз tPA и активатора плазминогена урокиназы (uPA). Предполагается, что основная роль uPA заключается в активации протеолитических реакций в межклеточном пространстве при связывании с её рецептором (uPAR), включающих также локальное образование плазмина. Плазмин опосредует деградацию внеклеточного матрикса либо сам по себе, либо в сочетании с матриксными металлопротеиназами. В этом сценарии PAI-1, связываясь с uPA ингибирует его действие, предотвращая этим образование плазмина. Дополнительное ингибирование опосредуется связыванием PAI-1 с рецепторным комплексом uPA, что приводит к деградации последнего. PAI-1 присутствует в повышенных количествах при ожирении и метаболическом синдроме (МС) [22]. Это связано с учащением случаев тромбоза у пациентов с такими состояниями. Возможно, данные изменения и являются одной из причин тяжёлого течения кардиореспираторной дисфункции при COVID-19 у пациентов с ожирением и МС. Вместе с тем, изучение гемостаза у больных с МС показало, что инсулинорезистентность и гипергликемия оказывают отрицательное влияние на состояние гемостазиограммы [23, 24]. Важная роль фибринолитической системы в патогенезе пневмонии обосновывается тем наблюдением, что угнетение бронхоальвеолярного фибринолиза начинается за несколько дней до клинического проявления пневмонии [6].

Анализ БАЖ пациентов с пневмонией и ОРДС показывает усиление активации процесса коагуляции и ингибирования фибринолиза, коррелирующих с тяжестью воспаления [25]. Проспективные клинические исследования также демонстрируют увеличение маркеров образования тромбина у пациентов с легким ОРДС, прогрессирующим до тяжелого [26]. У пациентов с ОРДС в БАЖ выявляются повышенные уровни растворимого ТФ и двухцепочечного фактора VII (FVIIa), что приводит к повышенному образованию тромбина [27–29]. D.L. Miller и соавт. [30] показали, что при повреждении лёгких ингибирование комплекса ТФ – FVIIa полностью устраняет внутрилегочное отложение фибрина. В то же время природные антикоагулянты недостаточно активируются при повышенной коагуляционной активности. Наряду со снижением уровней АПС, уровни растворимого тромбомодулина в жидкости при отеке легких у пациентов с ОРДС значительно выше, чем в плазме [31]. Считается, что это происходит из-за окисления тромбомодулина и выделения его с поверхности клетки, что связано с плохими клиническими исходами. Важность АТ в патогенезе повреждения легких, вызванного липополисахаридами, показано в исследованиях на крысах с эндотоксемией, введение которым высоких доз АТ предотвращает отложение легочного фибрина и повреждение легких [32]. Ингибитор пути тканевого фактора (ИПТФ) также способствует легочной коагулопатии при ОРДС. Хотя уровни ИПТФ были повышены в отечной жидкости у пациентов с ОРДС по сравнению с больными с гидростатическим отеком

легких, большая часть внутриальвеолярного ИПТФ была в инактивированной форме и, следовательно, не могла в достаточной степени блокировать прокоагулянтную активность комплекса ТФ-FVIIa [33].

Бронхоальвеолярный фибринолиз может играть важную роль в патогенезе ОРДС. PAI-1 увеличивается при ОРДС и, вероятно, секретируется эпителиальными клетками легких, фибробластами и эндотелиальными клетками [34]. В результате фибринолитическая способность БАЖ для пациентов с ОРДС заметно снижается. Более высокие уровни PAI-1 также связаны с более высокой смертностью у пациентов с ОРДС [35]. PAI-2, менее мощный ингибитор фибринолиза, который секретируется альвеолярными макрофагами, также, по-видимому, играет важную роль [36]. Липополисахарид-стимулированные альвеолярные макрофаги человека способны секретировать относительно большие количества PAI-2 [36].

Реакция системы бронхоальвеолярной коагуляции на воспаление. Активация коагуляции при воспалении – это физиологический процесс, который помогает сдерживать воспалительную активность или даже инфекцию на месте повреждения. Однако коагулопатия, вызванная воспалением легких, может усугубить повреждение легких и, таким образом, способствовать прогрессированию болезни.

Цитокины являются основными связывающими факторами между воспалением, изменениями свертывания крови и фибринолизом. Сходная медиаторная роль цитокинов в индуцированных эндотоксинами изменениях бронхоальвеолярной коагуляции и фибринолиза была установлена в экспериментах на шимпанзе с эндотоксемией [18]. Введение моноклональных антител против интерлейкина-6 (ИЛ-6) полностью устраняло вызванную эндотоксинами активацию образования бронхоальвеолярного тромбина, что указывает на то, что активация бронхоальвеолярной коагуляции зависит от ИЛ-6. Лечение анти-TNF- α только частично ингибировало активацию коагуляции. Альвеолярные макрофаги, вероятно, являются источниками провоспалительных цитокинов в легких. Активация альвеолярных макрофагов происходит через ядерный фактор каппа-би (NF- κ B), в результате прямой стимуляции его активации ТФ [37]. С другой стороны, коагуляция сама по себе может повлиять на бронхоальвеолярное воспаление. Коагуляция приводит к образованию протеаз, которые взаимодействуют со специфическими клеточными рецепторами, активируя внутриклеточные сигнальные пути. Комплекс ТФ-FVIIa может регулировать воспалительный ответ либо напрямую, либо через образование ФХа, тромбина и фибрина. Наиболее важным механизмом, с помощью которого протеазы свертывания крови влияют на воспаление, является связывание с рецепторами, активируемыми протеазой (PAR) [38]. Связывание ТФ-FVIIa с PAR-2 усиливает воспаление за счет продукции хемокинов и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), что может вызывать изменения проницаемости сосудов [39]. *In vitro* ТФ и FVIIa непосредственно усиливают продукцию активных форм кислорода макрофагами [40].

Тромбин, а также тромбосан А2, который продуцируется тканью легких, активируют тромбоциты, что приводит к широкому спектру клеточных ответов, которые могут способствовать развитию повреждения легких [41]. Следовательно, взаимодействия тромбоцитов и нейтрофилов играют важную роль в привлечении нейтрофилов в легкие во время повреждения легких и ОРДС.

Фибрин участвует в регулировании воспалительной реакции, которая восстанавливает структуру и функцию поврежденных тканей. Однако было описано, что чрезмерное отложение фибрина в легких оказывает прямое провоспалительное действие. Связывание фибрина с моноцитами активирует транскрипцию NF- κ B и PAI-1, которые, в свою очередь, регулируют продукцию различных цитокинов [37]. Кроме того, связывание фибрина с моноцитами, а также с другими клетками, такими, как фибробласты, усиливает воспалительный ответ, облегчая и усиливая миграцию клеток, и может в конечном итоге привести к фиброзу легких [2]. Фибрин может также напрямую нарушать функцию легких, инактивируя сурфактант, что приводит к потере эластичности легких и ателектазу [42].

Влияние антикоагулянтной терапии при коагулопатии легких. Терапевтические вмешательства, направленные на блокирование коагуляции или стимуляцию фибринолиза, теоретически могут ослабить воспалительную реакцию во время ОРДС и уменьшить повреждение легких. Гепарины обладают противовоспалительным действием, помимо их антикоагулянтных свойств [43]. Противовоспалительные свойства низкомолекулярного гепарина (НМГ) и нефракционированного гепарина включают ингибирование высвобождения провоспалительных цитокинов, таких, как TNF- α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1 β и трансформирующего фактора роста β (TGF- β), предотвращение адгезии лейкоцитов, ингибирование активации комплемента и повышение антиоксидантной активности эндотелиальных клеток сосудов [44]. Подавление активации NF- κ B также способствует проявлению вышеуказанных эффектов. Способствуют ли эти противовоспалительные механизмы положительному эффекту гепарина при лечении ОРДС, полностью не выяснено.

Экспериментальные исследования с легочной коагулопатией на моделях пневмонии у грызунов, продемонстрировали, что местное лечение гепарином ослабляет коагулопатию в легких и снижает физиологические признаки легочного повреждения [45]. Однако положительный эффект местного лечения гепарином на распространение бактерий и смертность не был подтвержден [45]. Хотя местное лечение гепарином действительно предотвращало легочную коагуляцию на моделях повреждения легких, вызванного эндотоксемией, оно не однозначно уменьшало повреждение легких [46], хотя, в некоторых предыдущих исследованиях, распыленный гепарин снижал концентрацию общего белка в бронхоальвеолярной жидкости, улучшал гистологию и процессы газообмена [47]. Инфузия нефракционированных

гепаринов действительно уменьшила отложения легочного фибрина и улучшила оксигенацию в модели повреждения легких у овец [48].

Закключение. Отложение фибрина присуще повреждению легких по разным причинам, включая ОРДС при COVID-19, и возможно, как вторичное повреждение легких по отношению к системному воспалению. Опосредованная путем ТФ-ФVIIa активация коагуляции, которой недостаточно противодействуют местные естественные ингибиторы коагуляции и одновременное подавление фибринолиза, приводит к аномальному обмену фибрина. Повреждение легких может усугубляться различными механизмами, такими, как протеазы свертывания крови, взаимодействующие со специфическими клеточными рецепторами, а также прямые и опосредованные эффекты ТФ-ФVIIa, FXa, тромбина и фибрина, что приводит к массивному поступлению в артериальный кровоток биологически активных веществ, факторов свертывания и клеточных агрегатов. И весь процесс стимулирует иммунореактивный ответ организма («цитокиновый» шторм, активирующий макрофаги, тромбоциты и клетки эндотелия) и происходит генерализация процесса с развитием системного воспалительного ответа и полиорганной недостаточности. Исходя из вышеизложенного, применение антикоагулянтной терапии, в дополнение имеющее противовоспалительное действие, может быть одной из терапевтических целей при коронавирусной инфекции. Вместе с тем, представляется целесообразным изучить влияние антикоагулянтных вмешательств в отношении клинически значимых кардиореспираторных параметров.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность проректору по науке Атаханову Шухрату Эргашевичу за техническую помощь в подготовке статьи.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–7, 9–22, 25–48 см. REFERENCES)

1. Чурляев Ю.А., Редкокаша Л.Ю. Роль тромбоцитарного сосудистого звена гемостаза в развитии легочных осложнений при тяжелой черепно-мозговой травме. *Общая реаниматология*. 2006; 2:22-5.
8. Питкевич Э.С., Угольник Т.С., Лызинов А.А., Брель Ю.И. Система гемостаза: физиология, патофизиология и медикаментозная коррекция. Учебно-методическое пособие. Гомель 2007. С.43
23. Махмудова А.Д., Исмазова М.Н., Сабиров И.С., Каюмов У.К. Некоторые показатели тромбоцитарного звена гемостаза при нарушении различных фаз гликемической кривой. *Евразийский вестник педиатрии*. 2020; 3(6); 88-92.
24. Каюмов У.К., Исмазова М.Н., Зиямухамедова М.М., Саипова М.Л. Оценка сопряженности протромбинового индекса с основными показателями гликемии. *Новый день в медицине*. 2020; 3(31); 552-6.

REFERENCES

- Churlyayev Yu. A., Redkokasha L. Yu. The role of platelet vascular hemostasis in the development of pulmonary complications in severe traumatic brain injury. *Obshchaya reanimatologiya*. 2006; 2:22-5. (in Russian)
- Glas G.J., Van der Sluijs K.F., Schultz M.J., Hofstra J.H., van der Poll T., Levi M. Bronchoalveolar hemostasis in lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Thromb. Haemost.* 2013; 11:17-25.
- Bellingan G.J. The pulmonary physician in critical care: the pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax*. 2002; 57:540-6.
- Laterre P.F., Wittebole X., Dhainaut J.F. Anticoagulant therapy in acute lung injury. *Crit. Care Med.* 2003; 31:329-36.
- Levi M., van der Poll T., Buller H.R. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*. 2004; 109:2698-704.
- Schultz M.J., Millo J., Levi M., Hack C.E., Weverling G.J., Garrard C.S., van der Poll T. Local activation of coagulation and inhibition of fibrinolysis in the lung during ventilator associated pneumonia. *Thorax*. 2004; 59:130-5.
- Haitsma J.J., Schultz M.J., Hofstra J.J., Kuiper J.W., Juco J., Vascetto R., Levi M., Zhang H., Slutsky A.S. Ventilator-induced coagulopathy in experimental Streptococcus pneumonia. *Eur. Respir. J.* 2008; 32:1599-606.
- Pitkevich Ye. S., Ugol'nik T. S., Lyzikov A. A., Brel' Yu. I. Hemostasis system: physiology, pathophysiology and drug correction [Uchebno-metodicheskoe posobie]. Gomel'; 2007. (in Russian)
- Mingming Xue, Zhan Sun, Mian Shao, Jun Yin, Zhi Deng, Jin Zhang et al. Diagnostic and prognostic utility of tissue factor for severe sepsis and sepsis-induced acute lung injury. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13 (1):172.
- Opal S.M. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit. Care Med.* 2000; 28:77-80.
- Altieri D.C. Inflammatory cell participation in coagulation. *Semin Cell Biol.* 1995; 6:269-74.
- Chapman H.A. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997; 9:714-24.
- Griffin J.H., Zlokovic B.V., Mosnier L.O. Activated protein C, protease activated receptor 1, and neuroprotection. *Blood*. 2018;132(2):159-69.
- Cornet A.D., Hofstra J.J., Vlaar A.P., Tuinman P.R., Levi M., Girbes A.R. et al. Activated protein C attenuates pulmonary coagulopathy in patients with acute respiratory distress syndrome. *Throm. and Haemost.* 2013; 11(5):894-901.
- Choi G., Schultz M.J., Levi M., Van der Poll T., Millo J.L., Garrard C.S. Protein C in pneumonia. *Thorax*. 2005; 60: 705-6.
- Choi G., Wolthuis E.K., Bresser P., Levi M., van der Poll T., Dzoljic M. et al. Mechanical ventilation with lower tidal volumes and positive end-expiratory pressure prevents alveolar coagulation in patients without lung injury. *Anesthesiology*. 2006; 105:689-95.
- Hoogerwerf J.J., de Vos A.F., Levi M., Bresser P., van der Zee J.S., Draing C. et al. Activation of coagulation and inhibition of fibrinolysis in the human lung on bronchial instillation of lipoteichoic acid and lipopolysaccharide. *Crit. Care Med.* 2009; 37:619-25.
- Levi M., van der Poll T., ten Cate H., Kuipers B., Biemond B.J., Jansen H.M., ten Cate J.W. Differential effects of anti-cytokine treatment on bronchoalveolar hemostasis in endotoxemic chimpanzees. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158: 92-8.
- Choi G., Hofstra J.J., Roelofs J.J., Florquin S., Bresser P., Levi M. et al. Recombinant human activated protein C inhibits local and systemic activation of coagulation without influencing inflammation during Pseudomonas aeruginosa pneumonia in rats. *Crit. Care Med.* 2007; 35:1362-8.
- Choi G., Hofstra J.J., Roelofs J.J., Rijneveld A.W., Bresser P., van der Zee J.S. et al. Antithrombin inhibits bronchoalveolar activation of coagulation and limits lung injury during Streptococcus pneumoniae in rats. *Crit. Care Med.* 2008; 36:204-10.
- Hofstra J.J., Haitsma J.J., Juffermans N.P., Levi M., Schultz M.J. The role of bronchoalveolar hemostasis in the pathogenesis of acute lung injury. *Throm. and Haemost.* 2008; 34:475-84.
- Carter J.C., Church F.C. Obesity and breast cancer: the roles of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and plasminogen activator inhibitor-1. *PPAR Res.* 2009; 2009:345320. doi:10.1155/2009/345320
- Makhmudova A.D., Ismatova M.N., Sabirov I.S., Kayumov U.K. Some indicators of the platelet link of hemostasis in violation of various phases of the glycemic curve. *Evrziyskiy vestnik pediatrii*. 2020; 3(6): 88-92. (in Russian)
- Kayumov U.K., Ismatova M.N., Ziyamukhamedova M.V., Saipova M.L. Assessment of the correlation of the prothrombin index with the main indicators of glycemia. *Novyi den' v meditsine*. 2020; 3(31): 552-6. (in Russian)
- Colling M.E., Kanthi Y. COVID-19-associated coagulopathy: An exploration of mechanisms. *Vasc. Med.* 2020 10; 25(5):471-8.
- Fuchs-Buder T., de Moerloose P., Ricou B., Reber G., Vifian C., Nicod L. et al. Time course of procoagulant activity and D dimer in bronchoalveolar fluid of patients at risk for or with acute-respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153:163-7.
- Idell S., Koenig K.B., Fair D.S., Martin T.R., McLarty J., Maunder R.J. Serial abnormalities of fibrin turnover in evolving adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol.* 1991; 261:240-8.
- Butenas S., Orfeo T., Mann K.G. Tissue factor in coagulation: which? where? when? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009;29(12):1989-96
- Butenas S., Brummel K.E., Bouchard B.A., Mann K.G. How factor VIIa works in hemophilia. *Thromb. Haemost.* 2003;1(6):1158-60.
- Miller D.L., Welty-Wolf K., Carraway M.S., Ezban M., Ghio A., Suliman H., Piantadosi C.A. Extrinsic coagulation blockade attenuates lung injury and proinflammatory cytokine release after intratracheal lipopolysaccharide. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2002; 26:650-8.
- Ware L.B., Fang X., Matthay M.A. Protein C and thrombomodulin in human acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2003;285:514-21.
- Okajima K. Antithrombin prevents endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting leukocyte activation. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 1998; 9(Suppl 2):25-37.
- Bastarache J.A., Wang L., Wang Z., Albertine K.H., Matthay M.A., Ware L.B. Intra-alveolar tissue factor pathway inhibitor is not sufficient to block tissue factor procoagulant activity. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2008; 294:874-81.
- Idell S. Endothelium and disordered fibrin turnover in the injured lung: newly recognized pathways. *Crit. Care Med.* 2002; 30:274-80.
- Prabhakaran P., Ware L.B., White K.E., Cross M.T., Matthay M.A., Olman M.A. Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 in pulmonary edema fluid are associated with mortality in acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2003; 285:20-8.
- Wygrecka M., Markart P., Ruppert C., Petri K., Preissner K.T., Seeger W., Guenther A. Cellular origin of pro-coagulant and (anti)-fibrinolytic factors in bleomycin-injured lungs. *Eur. Respir. J.* 2007; 29:1105-14.
- Yanqi Wu, Yahui Wang, Bo Liu, Yumei Cheng, Hong Qian, Huilin Yang et al. SN50 attenuates alveolar hypercoagulation and fibrinolysis inhibition in acute respiratory distress syndrome mice through inhibiting NF- κ B p65 translocation. *Respiratory Research*. 2020; 21:130.

COAGULOLOGY

38. Coughlin S.R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000; 407: 258–64.
39. Takahashi H., Shibuya M. The vascular endothelial growth factor(VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin.Sci. (Lond)*. 2005; 109: 227–41.
40. Cunningham M.A., Romas P., Hutchinson P., Holdsworth S.R., Tipping P.G. Tissue factor and factor VIIa receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages. *Blood*. 1999; 94: 3413–20.
41. Zarbock A., Singbartl K., Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 3211–9.
42. Seeger W., Gunther A., Thede C. Differential sensitivity to fibrinogen inhibition of SP-C- vs. SP-B-based surfactants. *Am. J. Physiol.* 1992; 262: 286–91.
43. Lucia Gozzo, Pierluigi Viale, Laura Longo, Daniela Cristina Vitale, Filippo Drago. The Potential Role of Heparin in Patients With COVID-19: Beyond the Anticoagulant Effect. A Review. *Frontiers in Pharmacology*. 2020; 11:1307.
44. Fryer A., Huang Y.C., Rao G., Jacoby D., Mancilla E., Whorton R. et al. Selective O-desulfation produces nonanticoagulant heparin that retains pharmacological activity in the lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997; 282: 208–19.
45. Ader F., Le B.R., Fackeur R., Raze D., Menozzi F.D., Viget N. et al. *In vivo* effect of adhesion inhibitor heparin on Legionella pneumophila pathogenesis in a murine pneumonia model. *Intensive Care Med.* 2008; 34: 1511–9.
46. Slofstra S.H., van Veer C., Buurman W.A., Reitsma P.H., ten Cate H., Spek C.A. Low molecular weight heparin attenuates multiple organ failure in a murine model of disseminated intravascular coagulation. *Crit. Care Med.* 2005; 33: 1365–70.
47. Hofstra J.J., Cornet A.D., de Rooy B.F., Vlaar A.P., van der Poll T, Levi M, Zaat S.A., Schultz M.J. Nebulized antithrombin limits bacterial outgrowth and lung injury in Streptococcus pneumoniae pneumonia in rats. *Crit. Care*. 2009; 13: R145.
48. Cox C.S., Zwischenberger J.B., Traber D.L., Traber L.D., Haque A.K., Herndon D.N. Heparin improves oxygenation and minimizes barotraumas after severe smoke inhalation in an ovine model. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1993; 176: 339.

Поступила 31.01.21
Принята к печати 15.04.21

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Душкин А.Д.¹, Афанасьев М.С.², Затевалов А.М.³, Алёшкин В.А.³, Миронов А.Ю.³, Афанасьев С.С.³, Несвижский Ю.В.², Борисова О.Ю.³, Гришачёва Т.Г.⁴, Караулов А.В.²

ЦИФРОВОЙ АНАЛИЗ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ ПОВЕРХНОСТИ ШЕЙКИ МАТКИ ПРИ ДИСПЛАЗИИ

¹Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения Москвы, 111123, Москва;

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава РФ, 119991, Москва;

³Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва;

⁴Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург

Цель исследования – провести количественную оценку изменений поверхности шейки матки при дисплазии с использованием цифрового анализа и компьютерных технологий. Диагностическая кольпоскопия с видеофиксацией проведена 90 пациенткам с дисплазиями лёгкой (CIN1), средней (CIN2), тяжёлой (CIN3) степени, в возрасте от 21 до 52 лет (средний возраст 33,9±8,13 лет). Предложенный алгоритм цифрового анализа выявил значения, которые помогают в классификации на до цитологическом и до молекулярно-генетическом этапах обследования пациента. Технический результат, получаемый с помощью предложенной методики, позволяет выявлять состояние поверхности шейки матки посредством объективной количественной оценки выраженности местных проявлений дисплазии. Значения для IndGV классифицируют в соответствии с типами дисплазии шейки матки по системе классификации CIN и степенями тяжести. Лёгкая степень дисплазии (CIN1) имеет IndGV=8,5, средняя степень дисплазии (CIN2) – IndGV=13, тяжёлая степень дисплазии (CIN3) имеет IndGV=15,6. Площадь поражённой поверхности шейки матки при CIN1 (IndInt=0,17), CIN2 (IndInt=0,19), CIN3 (IndInt=0,22). Степень выраженности изменений имеет прямую зависимость с диапазоном изменения значений серого цвета, что и позволяет провести количественную классификацию при цифровом анализе. Методика выполняется в режиме реального времени и не требует значительных материальных вложений, что позволяет использовать её после проведения клинического осмотра и прогнозировать дальнейшее ведение пациентки.

Ключевые слова: цифровой анализ; дисплазия шейки матки; количественный подход.

Для цитирования: Душкин А.Д., Афанасьев М.С., Затевалов А.М., Алёшкин В.А., Миронов А.Ю., Афанасьев С.С., Несвижский Ю.В., Борисова О.Ю., Гришачёва Т.Г., Караулов А.В. Цифровой анализ и количественная оценка изменений поверхности шейки матки при дисплазии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (7): 417-421.

DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-417-421>

Dushkin A.D.¹, Afanasiev M.S.², Zatevalov A.M.³, Aleshkin V.A.³, Mironov A.Yu.³, Afanasiev S.S.³, Nesvizhsky Yu.V.², Borisova O.Y.³, Grishacheva T.G.⁴, Karaulov A.V.²

DIGITAL ANALYSIS AND QUANTITATIVE ASSESSMENT OF THE CERVICAL SURFACE WITH DYSPLASIA

¹The Loginov Moscow Clinical Scientific Center is State Institution funded by Moscow Health Department, Moscow, Russian Federation;

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation;

³G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

⁴First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Saint Petersburg, Russian Federation

The investigation aims – a quantitative assessment of cervical surface changes with digital analysis and computer technologies in dysplasia. Colposcopy was made in 90 women from 21 to 52 years (avr. age 33,9±8,13 y.o.) with mild epithelial dysplasia (CIN1), moderate dysplasia (CIN2), severe dysplasia (CIN3). The algorithm detected indicators which provide the cervical dysplasia classification on pre cytological and pre molecular-genetic patients investigations. The outcome of an algorithm was the identification of the cervix surface condition severity by an objective quantification. The cervical dysplasia type (CIN) was classified as IndGV values. The mild dysplasia (CIN1) had IndGV=8,5, moderate dysplasia (CIN2) – IndGV=13, severe dysplasia (CIN3) – IndGV=15,6. The cervical affected surface area (IndInt) equalled 0,17 in CIN1, 0,19 in CIN2, 0,22 in CIN3. A change severity has a direct relation with a grey color value. It demonstrates quantify classification in digital analysis. The algorithm is used in real-time mode and no requires considerable material outlays. This makes it possible to use an algorithm after clinical examination and predict patient management.

Key words: digital analysis; cervical dysplasia; quantitative approach.

For citation: Dushkin A. D., Afanasiev M. S., Zatevalov A. M., Aleshkin V. A., Mironov A. Yu., Afanasiev S. S., Nesvizhsky Yu. V., Borisova O. Y., Grishacheva T. G., Karaulov A. V. Digital analysis and quantitative assessment of the cervical surface with dysplasia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (7): 417-421 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-417-421>

For correspondence: Dushkin A. D., resident of the oncology department, e-mail: alex.duschckin2013@yandex.ru

Для корреспонденции: Душкин Александр Дмитриевич, клинический ординатор; ee-mail: alex.duschckin2013@yandex.ru

Information about authors:

Dushkin A. D., <https://orcid.org/0000-0002-8013-5276>;
Afanasyev M. S., <https://orcid.org/0000-0002-5860-4152>;
Zatevalov A. M., <http://orcid.org/0000-0002-1460-4361>;
Алешкин В.А., <https://orcid.org/0000-0002-2701-431X>;
Mironov A. Yu., <http://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Afanasyev S. S., <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>;
Nesvizhsky Yu. V., <http://orcid.org/0000-0003-0386-3883>;
Borisova O. Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;
Grishacheva T. G., <https://orcid.org/0000-0002-9515-914X>;
Karaulov A. V., <https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>.

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

Acknowledgement. *The study had no sponsorsupport.*

Received 23.11.2020
Accepted 30.11.2020

Введение. Дисплазия шейки матки (ШМ) относится к предраковым изменениям и представляет собой изменения клеточного строения, нарастание атипизма клеток. Такое состояние называют цервикальной интраэпителиальной неоплазией (CIN) – изменения, происходящие в пределах эпителиального пласта и не нарушающие целостность базальной мембраны. В мире ежегодно диагностируют более 30 млн случаев лёгкой дисплазии ШМ и более 10 млн случаев с тяжёлой степенью дисплазии ШМ [15]. По данным ВОЗ на 2018 г. приблизительно 311 тыс. женщин умерло от рака ШМ [11]. В 2018 году во всем мире зарегистрировано 569 847 новых случаев. Из них 4,07% приходится на возраст от 5 до 29 лет, 53,85% от 30 до 54 лет, 42,07% 55 лет и старше [12]. На 2017 год приходится 17 576 новых случаев рака ШМ по данным онкорегистра. Дисплазия ШМ в большинстве случаев протекает бессимптомно и обнаруживается при исследовании мазка по Папаниколау (ПАП-тест). ПАП-тест и жидкостная цитология с использованием различных систем, в том числе CytoScreen (автоматическое приготовление, окрашивание, оценка препарата) относится к цитологическим методам определения состояния ШМ. Приблизительно 10% цитологических мазков являются неадекватными, что связано с ошибками в технике взятия материала и приготовления [16, 17]. Материал получают с использованием цитощётки при скрининге или с диагностической целью, в том числе во время диагностической кольпоскопии. Интерпретация результатов происходит в соответствии с морфологией клеток [9]. Чувствительность и специфичность методики составляет 53-74% и 63,2-97%, соответственно [13].

Фон для дисплазии могут создавать урогенитальные инфекции, различные механические и физические воздействия. Вирус папилломы человека (ВПЧ) является основной причиной развития дисплазии и рака шейки матки. Для выявления папилломавирусной инфекции используют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), а определения вирусной нагрузки – метод «гибридного захвата» – Digene-тест [10]. При положительном результате указывают клинически значимую концентрацию 13 типов ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР), в копиях ДНК ВПЧ на 1 мл образца. Отрицательный результат практически исключает присутствие CIN2/3 [18]. Чувствительность

и специфичность методики ПЦР диагностики составляет 99% и 78%, соответственно [14]. Комбинация ПАП-теста и Digene-теста является «золотым» стандартом в диагностике ВПЧ-ассоциированной дисплазии ШМ [8]. Лечение дисплазии ШМ осуществляют инвазивными и неинвазивными методиками, одной из которых является фотодинамическая терапия.

Заподозрить патологию шейки матки позволяет диагностическая кольпоскопия [7]. Диагностическая кольпоскопия включает проведение пробы с 3-5% раствором уксусной кислоты и пробы Шиллера с раствором Люголя [8]. Уксусная кислота позволяет выявлять патологию ШМ, формируя ацетобелый эпителий (АБЭ). АБЭ может быть проявлением не только дисплазии, но и атрофического или метаплазированного эпителия. Раствор Люголя окрашивает зрелые клетки поверхностного слоя равномерно в тёмно-коричневый цвет. Чёткость очерченных контуров и интенсивность окрашивания эпителия считают подозрительной в отношении клеточной атипии. Кольпоскопическое исследование позволяет дифференцировать визуальные изменения нормальных клеток эпителия от различных патологических процессов ШМ и даёт возможность наблюдать за динамикой течения заболевания. Существенным недостатком данной методики является субъективная оценка видимых изменений на поверхности шейки матки.

Цифровой анализ изображений – анализ, в котором используются вычислительные мощности графического процессора видеокарты персонального компьютера и специализированное программное обеспечение для загрузки и обработки видео-/фотоматериалов. Применение данных методик находит место в медицинской практике, для количественной оценки атипичных клеток и тканей. Современные видеофиксирующие инструменты с высоким разрешением линз переводят изображения в различные форматы для анализа с помощью программного обеспечения (ПО). Видеокольпоскоп позволяет проводить диагностическую кольпоскопию с одновременной видеофиксацией. Такая методика снижает время создания стека изображений для цифровой обработки и анализа. Цифровую обработку проводят с использованием различных программ, одной из которых является ImageJ [3]. Комбинация вычислительных мощностей

графического процессора и внутренних алгоритмов ПО минимизирует влияние субъективной оценки при постановке диагноза. ПО находится в свободном доступе и не требует финансовых вложений для установки на персональный компьютер.

Цель исследования – провести количественную оценку изменений поверхности шейки матки при дисплазии с использованием цифрового анализа и компьютерных технологий.

Материал и методы. Диагностическая кольпоскопия с видеофиксацией проведена 90 пациенткам с дисплазиями лёгкой (CIN1), средней (CIN2), тяжёлой (CIN3) степени, в возрасте от 21 до 52 лет (средний возраст $33,9 \pm 8,13$ лет). Видеокольпоскоп Kernel KN-2200-A делает видеозапись в высоком качестве цифрового разрешения Full HD (1920×1080), которую в последующем используют для создания изображений высокой чёткости и выгрузки в программу ImageJ. Степень дисплазии определяют с использованием «золотого» стандарта диагностики – ПАП-тест и Digene-тест. Проведён цифровой анализ 90 изображений после проведённой диагностической кольпоскопии с уксусной пробой. Каждое изображение выгрузили в ПО ImageJ. ПО ImageJ установлена на персональный компьютер MacBook Pro (16-inch, 2019), процессор Intel Core i9 – 8 ядер, 2,3 ГГц, 16 Гб оперативной памяти DDR4, графический процессор – AMD Radeon Pro 5500M 4 GB. Файлы переводили в 8-битный формат и проводили оценку значений серого цвета (0 – чёрный и 255 – белый). Значение серого цвета количественно определяет интенсивность изменений АБЭ. После перевода в 8-битный формат, выделяют область ШМ на всем изображении. Функция Auto Threshold в ПО ImageJ производит автоматический подсчёт значений серого цвета на выделенной области. В соответствии со значениями интенсивности серого цвета отсекаются значения нормального эпителия поверхности ШМ. Функция Measure ПО ImageJ производит автоматизированный подсчёт % АБЭ от общей площади в соответствии со значениями серого цвета. Данная функция автоматизированного подсчёта производит подсчёт общей площади выделенной области, среднее значение серого цвета АБЭ, минимальное и максимальное значение серого. Разница между максимальным и минимальным значением определена как диапазон изменений серого цвета. Опираясь на значения, полученные автоматизированным подсчётом, выведе-

ны формулы (1, 2), позволяющие оценить течение дисплазии ШМ.

$$\text{IndInt} = \frac{\frac{\%Area}{100}}{Area}, \quad (1)$$

где IndInt – индекс интенсивности поражённой области;

Area – общая площадь поверхности шейки матки;

%Area – процент поражённой области поверхности шейки матки.

$$\text{IndGV} = \text{IndInt} \times dGV, \quad (2)$$

где IndGV – индекс интенсивности единый;

IndInt – индекс интенсивности поражённой области;

dGV – диапазон изменений серого цвета.

Статистический анализ полученных значений проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office 365 пакет Excel, статистические пакеты Rstudio программного обеспечения PyCharm v. 2020.1.3 [2,6]. Статистическую обработку данных производили методом ANOVA с использованием доверительных интервалов (CI95%) и значением Р-критерия ($p < 0,05$). Для проведения цифрового анализа использовали программное обеспечение ImageJ [3] и персональный компьютер MacBook Pro (16-inch, 2019), процессор Intel Core i9 – 8 ядер, 2,3 ГГц, 16 Гб оперативной памяти DDR4, графический процессор – AMD Radeon Pro 5500M 4 GB. Достоверность различий между группами для IndGV оценивалась с помощью метода ANOVA с использованием F-критерия, который может быть применён для определения статистической значимости различий между группами. Метод выбран из-за того, что его считают робастным и он может работать даже в ситуациях, когда некоторые условия нарушаются [5].

Результаты. Цифровой анализ визуальных изменений показал, что IndInt для CIN1, CIN2, CIN3 имеет статистически значимые различия, представленные в табл. 1, которые можно охарактеризовать количественно. Внутри групп значения для IndInt до ФДТ: CIN1 (CI95%=0,0826-0,1045; SD=0,025; $p=0,0116$), CIN2 (CI95%=0,0867-0,113; SD=0,03; $p=0,0114$), CIN3 (CI95%=0,1-0,123; SD=0,025; $p=0,0117$) в соответствии с критериями описательной статистики. Внутри групп значения для IndInt после ФДТ: CIN1 (CI95%=0,0115-0,0235; SD=0,0137; $p=0,0064$), CIN2 (CI95%=0,013-0,0234; SD=0,012; $p=0,0057$), CIN3 (CI95%=0,0146-0,0237; SD=0,0104; $p=0,0032$) в соответствии с критериями описательной статистики. Оценку различий между двумя выборками (до и после ФДТ) определяли

Таблица 1

Индекс интенсивности для CIN1, CIN2, CIN3

Показатели	CIN1	CIN2	CIN3
Mean	0.17	0.19	0.22
SD	0.041	0.04	0.047
CI(95%)нижнее	0.15	0.175	0.21
CI(95%)верхнее	0.18	0.2	0.24

Примечание. Здесь и в табл. 2,3: Mean – среднее значение, SD – стандартное отклонение, CI95% – доверительный интервал.

Таблица 2

Данные для IndGV внутри групп

Показатели	CIN1	CIN2	CIN3
Mean	8.5	13	15.6
SD	3.4	4.4	5.5
CI(95%)левое	7.28	11.5	13.38
CI(95%)правое	9.77	14.6	17.8

Примечание. Здесь и в табл. 4: CIN – цервикальная интраэпителиальная неоплазия.

Таблица 3

ANOVA для IndGV (CIN1-CIN2, CIN2-CIN3, CIN1-CIN3)

Показатели	Между CIN1 и CIN2	Между CIN2 и CIN3	Между CIN1 и CIN3
F-критерий	20.57	3.35	30.93
F критическое	4.012	4.012	4.012
P-значение	0.00028	0.072	0.000065

при помощи t-критерия Стьюдента. Значения t-теста для выборки CIN1 ($t=2,67, p=0,0113$), для CIN2 ($t=2,54, p=0,0155$), CIN3 ($t=3,45, p=0,00114$).

Значения, полученные для групп с CIN1 (IndInt=0,17), CIN2 (IndInt=0,19), CIN3 (IndInt=0,22) имеют отличия, которые позволяют судить о различной площади поражённой поверхности шейки матки. Последующим перемножением индекса интенсивности поражённой области и диапазона значений серого цвета можно получить значение IndGV – индекс интенсивности единый. IndGV позволяет судить о степени тяжести патологического процесса. Для оценки значимости значений IndGV – CIN1, IndGV – CIN2, IndGV – CIN3, использованы методы описательной статистики (табл. 2) и ANOVA (табл. 3). Статистически значимые различия выявлены между группами CIN1-CIN2 (CI95% 7,28-9,77, $p=0,00028$) и CIN1-CIN3 (CI95% 11,5-14,6, $p=0,000065$). Между группой CIN2-CIN3 (CI95% – 13,38-17,8, $p=0,072$) статистически менее значимо, но различия все равно присутствуют.

Заключение. Предложенный алгоритм цифрового анализа выявил значения, которые помогают в классификации на доцитологическом и домолекулярно-генетическом этапах обследования пациента. Технический результат, получаемый с помощью предложенной методики, позволяет выявлять состояние поверхности шейки матки посредством объективной количественной оценки выраженности местных проявлений дисплазии. Значения для IndGV классифицируют в соответствии с типами дисплазии шейки матки по системе классификации CIN и степенями тяжести. Лёгкая степень дисплазии (CIN1) имеет IndGV=8,5, средняя степень дисплазии (CIN2) – IndGV=13, тяжёлая степень дисплазии (CIN3) имеет IndGV=15,6. Площадь поражённой поверхности шейки матки при CIN1 (IndInt=0,17), CIN2 (IndInt=0,19), CIN3 (IndInt=0,22). Степень выраженности изменений имеют прямую зависимость с диапазоном изменения значений серого

цвета, что и позволяет провести количественную классификацию при цифровом анализе. Методика происходит в режиме реального времени и не требует значительных материальных вложений, что позволяет использовать её после проведения клинического осмотра и прогнозировать дальнейшее ведение пациентки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-13, 17 см. REFERENCES)

14. Комарова Е.В., Минкина Г.Н., Гаврикова М.В., Храмова О.К. Вирус папилломы человека – тестирование и генотипирование интраэпителиальных неоплазий. *Медицина критических состояний*. 2010; 1(1): 54-61.
15. Протасова А.Э., Дзюбий Т.И., Раскин Г.А., Тапильская Н.И., Зазерская И. Е., Хаджиева Э. Д. Дисплазия шейки матки – этиопатогенез, диагностика, оптимальная тактика лечения: учебное пособие. СПб; 2014.
16. Шейка матки, влагалище, вульва. Физиология, патология, кольпоскопия, эстетическая коррекция: руководство для практикующих врачей. Роговская С. И., Липовая Е. В., ред. М.: Редакция журнала Status Praesens; 2014.
18. Адамян Л.В., Артымук Н.В., Ашрафян Л.А., Баранов И.И., Байрамова Г.Р. и др. Доброкачественные и предраковые заболевания шейки матки с позиции профилактики рака: клинические рекомендации. Письмо Минздрава РФ от 02.11 2017 г. № 15-4.10.2-7676.

REFERENCES

1. Boone J.D., Erickson B.K., Huh W.K. New insights into cervical cancer screening. *Journal of Gynecologic Oncology*. 2012; 23(4): 282-7. doi:10.3802/jgo.2012.23.4.282.
2. JetBrains, 2017. Pycharm. [online] JetBrains. Available at: <<https://www.jetbrains.com/pycharm/>> [Accessed 11 April 2017].
3. Rasband W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.
4. Nayar R., Wilbur D. C. The Pap test and Bethesda 2014. *Cancer Cytopathology*. 2015; 123(5): 271-81. doi: 10.1002/ccnc.21521.

5. Boslaugh S. Statistics in a Nutshell. 2nd ed.. Publisher(s): O'Reilly Media, Inc.; 2012. ISBN: 9781449361129.
6. Ross I., Gentleman R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*. 1996; 5(3): 299-314. doi: 10.2307/1390807.
7. Waxman A.G., Conageski C., Silver M.I., Tedeschi C., Stier E.A., Apgar B. et al. . ASCCP Colposcopy Standards: How Do We Perform Colposcopy? Implications for Establishing Standards. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2017; 21(4): 235-41. doi: 10.1097/LGT.0000000000000336.
8. World Health Organization. Comprehensive Cervical Cancer Control. Geneva. 2014. 366-78. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144785/1/9789241548953_eng.pdf?ua=1.
9. Dhakal R., Makaju R., Sharma S., Bhandari S., Shrestha S., Bastakoti R. Correlation of Cervical Pap Smear with Biopsy in the Lesion of Cervix. *Kathmandu University medical journal* (KUMJ). 2016; 14(55): 254-7.
10. Gillio-Tos A., De Marco L., Carozzi F. M., Del Mistro A., Girlando S., Burrone E. et al. Clinical impact of the analytical specificity of the hybrid capture 2 test: data from the New Technologies for Cervical Cancer (NTCC) study. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(9):2901-2907. doi:10.1128/JCM.01047-13.
11. World Health Organization; 2018. URL: https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab_1.
12. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2018. URL: <https://www.iarc.fr/>.
13. Mayrand M. H., Duarte-Franco E., Coutlée F. et al. Randomized controlled trial of human papillomavirus testing versus Pap cytology in the primary screening for cervical cancer precursors: design, methods and preliminary accrual results of the Canadian cervical cancer screening trial (CCCaST). *International Journal of Cancer*. 2006; 119(3):615-23. doi:10.1002/ijc.21897.
14. Komarova E.V., Minkina G.N., Gavrikova M.V., Khramova O.K. Human papillomavirus – testing and genotyping of intraepithelial neoplasias. *Meditsina kriticheskikh sostoyaniy*. 2010; 1(1): 54-61. (in Russian)
15. Protasova A.E., Dzyubiy T.I., Raskin G.A., Tapilskaya N.I., Zazerskaya I.E., Khadzhieva E.D. Cervical dysplasia – etiopathogenesis, diagnosis, optimal treatment tactics [Displaziya sheyki matki – etiopatogenez, diagnostika, optimal'naya taktika lecheniya uchebnoe posobie]. St.Petersburg; 2014. (in Russian)
16. Cervix, vagina, vulva. Physiology, pathology, colposcopy, aesthetic correction: guideline for medical doctors. Rogovskaya S. I., Lipovoy E. V., eds.; Moscow: Editorial office Status Praesens; 2014. (in Russian)
17. Nayr R., Wilbur D. C. The Pap Test and Bethesda 2014. *Acta Cytologica*. 2015; 59(2): 121-32. doi: 10.1159/000381842.
18. Adamyan L.V., Artymuk N.V., Ashrafyan L.A., Baranov I.I., Bayramova G.R. et al. Benign and premalignant cervical diseases from the perspective of cancer prevention: clin. Guidelines. Pis'mo Minzdrava RF ot02.11. 2017; 15-4.10.2-7676. (in Russian)

Поступила 23.11.20
Принята к печати 30.11.20

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Давидович Н.В., Соловьёва Н.В., Галиева А.С., Лепёшкин С.Ю., Башилова Е.Н., Писарева С.Н., Бажукова Т.А.

РОЛЬ СИСТЕМЫ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ В НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЕ ПОЛОСТИ РТА ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПАРОДОНТА

ФГБОУ ВО Северный государственный медицинский университет Минздрава РФ, 163000, г. Архангельск, Россия

Система антимикробных пептидов (АМП) является одним из наиболее древних механизмов устойчивости организма к инвазии инфекционными патогенами. Цель работы – установление роли системы АМП и маркерных пародонтопатогенов в развитии и прогрессировании воспалительных заболеваний пародонта. Для исследования получены смывы зубодесневого кармана (91 образец) пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта (хронический пародонтит и гингивит) и интактным пародонтом. С помощью ИФА определяли содержание АМП: человеческого альфа-дефензина (HNP 1-3), бета-дефензина (HBD 1-3), кателицидина (LL-37). Маркерные пародонтопатогены выделяли в ПЦР в режиме реального времени. В ходе исследования выявлены различия в концентрациях АМП по группам: уровни HBD 2 у пациентов с хроническим пародонтитом в 1,36 раз превышали показатели группы пациентов с хроническим гингивитом ($p=0,023$) и в 2,39 раз показатели группы контроля ($p<0,001$), содержание HNP 1-3 в группе пациентов с хроническим пародонтитом снижено в 1,23 раза в сравнении с показателями группы пациентов с гингивитом ($p=0,045$) и в 1,97 раз в сравнении с показателями группы контроля ($p<0,001$). Частота выявления генов пародонтопатогенных бактерий составила 88,0% у пациентов с пародонтитом, 76,92% у пациентов с гингивитом и 33,3% в группе с интактным пародонтом. Содержание HBD 2 умеренно коррелировало с определением *P. gingivalis* ($r=0,612$; $p=0,022$), *T. forsythensis* ($r=0,434$; $p=0,015$), *A. actinomycetemcomitans* ($r=0,483$; $p=0,006$), умеренная отрицательная корреляция выявлялась между содержанием HNP 1-3 и выделением пародонтопатогенов в ассоциациях (*P. gingivalis* с *T. forsythensis* и *T. denticola*) ($r=-0,388$; $p=0,031$) в группе пациентов с хроническим пародонтитом. Выявленные взаимосвязи и корреляции свидетельствуют о сдвигах в процессах репаративной регенерации полости рта и регуляции местного иммунитета в ответ на микробную инвазию.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; неспецифические факторы защиты; воспалительные заболевания пародонта; пародонтопатогенные бактерии.

Для цитирования: Давидович Н.В., Соловьёва Н.В., Галиева А.С., Лепёшкин С.Ю., Башилова Е.Н., Писарева С.Н., Бажукова Т.А. Роль системы антимикробных пептидов в неспецифической защите полости рта при воспалительных заболеваниях пародонта. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (7): 422-427. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-422-427>

Davidovich N.V., Solovieva N.V., Galieva A.S., Lepeshkin S.Yu., Bashilova E.N., Pisareva S.N., Bazhukova T.A.

ROLE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES SYSTEM IN INFLAMMATORY PERIODONTAL DISEASES NON-SPECIFIC ORAL CAVITY PROTECTION

FSBEI HE Northern State Medical University (Arkhangelsk) of the Ministry of Health of the Russian Federation, 163000, Arkhangelsk, Russia

The system of antimicrobial peptides (AMP) is one of the most ancient mechanisms of the macroorganism resistance to infectious pathogens invasion. The aim of the study was to determine the role of the antimicrobial peptides system and periodontal pathogenic markers in the development and progression of inflammatory periodontal diseases. Gingival pocket washes (91 samples in total) for the research were received from patients with inflammatory periodontal diseases (chronic periodontitis and gingivitis) and intact periodontium. Using ELISA, the content of antimicrobial peptides was determined: human alpha-defensin (HNP 1-3), beta-defensin (HBD 1-3) and cathelicidin (LL-37). Periodontal pathogenic markers were isolated during RT-PCR. The study revealed differences in AMP concentrations by groups: level of HBD 2 in patients with chronic periodontitis was 1,36 times higher than those in the group of patients with chronic gingivitis ($p=0,023$) and 2,39 times higher than those in the control group ($p<0,001$), the content of HNP 1-3 in the group of patients with chronic periodontitis was reduced by 1,23 times compared with the indicators of the group of patients with gingivitis ($p=0,045$) and by 1,97 times compared with the indicators of the control group ($p<0,001$). The frequency of detection of periodontal pathogenic bacteria genes was 88,0% in patients with periodontitis, 76,92% in patients with gingivitis and 33,3% in the group with intact periodontium. HBD 2 content moderately correlated with the definition of *P. gingivalis* ($r=0,612$; $p=0,022$), *T. forsythensis* ($r=0,434$; $p=0,015$), *A. actinomycetemcomitans* ($r=0,483$; $p=0,006$), a moderate negative correlation was detected between the content of HNP 1-3 and the release of periodontal pathogens in associations (*P. gingivalis* with *T. forsythensis* and *T. denticola*) ($r=-0,388$; $p=0,031$) in the group of patients with chronic periodontitis. Thus, the revealed relationships and correlations indicate shifts in the processes of reparative regeneration of the oral cavity and the regulation of local immunity in response to microbial invasion.

Key words: antimicrobial peptides; nonspecific defense factors; inflammatory periodontal diseases; periodontal pathogenic bacteria.

For citation: Davidovich N.V., Solovieva N.V., Galieva A.S., Lepeshkin S.Yu., Bashilova E.N., Pisareva S.N., Bazhukova T.A. Role of antimicrobial peptides system in inflammatory periodontal diseases non-specific oral cavity protection. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (7): 422-427 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-422-427>

For correspondence: Davidovich Nataliia Valerievna, candidate of medical sciences, associate professor of the Department of Clinical Biochemistry, Microbiology and Laboratory Diagnostics; e-mail: nvdavidovich@gmail.com

Information about authors:

Davidovich N.V., <https://orcid.org/0000-0002-6414-9870>;
Solovieva N.V., <https://orcid.org/0000-0002-0664-4224>;
Galieva A.S., <http://orcid.org/0000-0002-7037-7730>;
Lepeshkin S.Yu., <https://orcid.org/0000-000203226-1032>;
Bashilova E.N., <https://orcid.org/0000-0002-9247-6633>;
Pisareva S.N., <https://orcid.org/0000-0003-0793-4749>;
Bazhukova T.A., <https://orcid.org/0000-0002-7890-2341>.

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

Acknowledgment. The study is supported by the project «Norwegian-Russian network in antimicrobial stewardship in dental practice in the Circumpolar Region» (project leader – associate professor of Department of Clinical Dentistry, Arctic University in Tromsø, PhD, FHEA Mohammed A. Haroni).

Received 15.03.2021
Accepted 24.04.2021

Введение. Аспекты возникновения и течения воспалительных заболеваний пародонта (ВЗП) являются актуальной проблемой в связи с высокой распространённостью стоматологической патологии и её тесной связью с нарушениями местного иммунитета и снижением общей реактивности организма [1, 2]. Механизмы ВЗП характеризуются закономерным чередованием процессов альтерации и репаративной регенерации, находясь при этом под постоянным иммунобиологическим надзором. В развитии и прогрессировании ВЗП, по данным исследователей, ведущую роль играют активация процессов перекисного окисления липидов, перекрестная сенсибилизация к тканям пародонта в ответ на микробную инвазию на фоне иммунных нарушений, тканевая гипоксия, непосредственно вызывающая нарушение процессов репаративной регенерации ротовой полости, состояние факторов врождённого иммунитета полости рта [3–5].

Механизмы врождённого иммунитета полости рта представлены продукцией белковых молекул, обладающих выраженной антимикробной активностью, что является одним из наиболее древних механизмов устойчивости организма к инвазии инфекционными патогенами [6]. Механизмы местного врождённого иммунитета полости рта, в отличие от механизмов адаптивного иммунного ответа, активируются сразу после внедрения различных патогенных микроорганизмов, обеспечивая первую линию противоинфекционной защиты. Молекулярными компонентами такой неспецифической защиты полости рта являются антимикробные пептиды (АМП) [7]. АМП представляют собой амфифильные молекулы, состоящие из 12–50 аминокислотных остатков, с выраженным бактерицидным действием. Современные классификации выделяют анионные, катионные, линейные амфифильные – спиральные пептиды, пептидные фрагменты и пептиды, обогащённые цистеиновыми аминокислотными остатками. Наибольшую клиническую значимость представля-

ет класс катионных АМП, включающих в себя дефензины, кателицидины, гистатины. альфа-дефензины (HNP 1-3) человека синтезируются в промиелоцитах и миелоцитах в виде про-HNP и хранятся в виде зрелых HNP в гранулах азурофилов, прежде чем достигнут тканей пародонта, обеспечивая такие регуляторные эффекты как адгезию и миграцию иммунокомпетентных клеток. бета-дефензин HBD-1 человека секретируется конститутивно, в то время как инфекционный процесс и воспаление влияют на секрецию HBD-2 и HBD-3, выполняющих функцию хемоаттрактантов для дендритных и Т-клеток, макрофагов, и обеспечивающих репарацию эпителия. Кателицин (LL-37) секретируется в виде неактивного предшественника в нейтрофильных гранулах и, в меньшей степени, эпителиальных клетках, тогда как экспрессия пептида происходит в воспалённых тканях дёсен, слизистой оболочке рта и эпителии языка, обеспечивая хемоаттракцию нейтрофилов, моноцитов и Т-клеток в очаг воспаления, активацию антигенпрезентирующих клеток [8, 9].

Показано, что факторы десневой жидкости могут отражать состояние полости рта и быть предиктором развития кариеса, [10], пародонтита [11], рака полости рта [12–14]. При исследовании содержания АМП выявлено, что концентрации альфа-дефензина в десневой жидкости и отделяемом пародонтальных карманов увеличивались от 3-х до 60 раз при воспалительных заболеваниях пародонта в одних исследованиях [15] и снижались [16]. АМП могут оказывать влияние на процессы воспаления, пролиферации, ранозаживления, продукцию цитокинов, хемотаксис иммунокомпетентных клеток [17]. Показана роль системы АМП как прогностического критерия при развитии процессов воспаления в биотопах полости рта [18, 19], однако их роль в механизмах развития, прогрессирования, исхода воспаления тканей пародонта, взаимосвязь с маркерными пародонтопатогенами, изучена недостаточно. Возможно, именно определение концентрации АМП ротовой полости при ВЗП дадут возможность контролировать и прогноиро-

вать течение патологического процесса и предупредить трансформацию гингивита в пародонтит.

Цель исследования – установить роль системы антимикробных пептидов и маркёрных пародонтопатогенов в развитии и прогрессировании воспалительных заболеваний пародонта.

Материал и методы. Обследованы 64 больных в возрасте от 18 до 59 лет с воспалительными заболеваниями пародонта, находящихся на амбулаторном лечении, и 27 практически здоровых лиц такого же возраста. От каждого пациента получено добровольное информированное согласие. В ходе обследования пациенты разделены на 3 группы: 1-я группа – пациенты с диагнозом «хронический пародонтит» лёгкой, средней и тяжёлой степени в соответствии с МКБ 10: K05.31 – хронический (генерализованный) пародонтит (лёгкая, средняя, тяжёлая степень) ($n=25$); 2-я группа – пациенты с диагнозом «хронический гингивит» в соответствии с МКБ 10: K05.10 – хронический (простой маргинальный гингивит) ($n=39$); 3-я группа – контрольная (пациенты с интактным пародонтом) ($n=27$).

Клиническим материалом служили смывы зубодесневого кармана (ЗДК), полученные в ходе амбулаторного обследования путём аспирации с помощью стерильного шприц-тюбика. Полученную пробу центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 минут. Аликвоты образцов замораживали и хранили при -80°C до проведения молекулярно-генетических и иммунологических исследований. Содержание АМП: альфа-дефензина HNP 1-3, бета-дефензина (HBD 1-3), кателицидина LL-37 человека в смывах ЗДК определяли с помощью ИФА согласно инструкциям к наборам производителя («Nucult Biotech», Нидерланды). Измерение оптической плотности содержимого ячеек планшета регистрировали на фотометре «Multiscan EX» («Thermo Fisher Scientific», США). Результаты рассчитывали в соответствии с прилагаемым к наборам инструкциям по калибровочным кривым, построенным на основании измерения стандартов.

Для выявления маркёрных патогенных микроорганизмов: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*,

Porphyromonas gingivalis, *Prevotella intermedia*, *Candida albicans* применялся метод ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР) в соответствии с инструкциями к наборам производителя («ПародонтоСкрин», ООО «ДНК-Технология», РФ).

Статистическая обработка полученных результатов, оценка распределения показателей, сравнительный анализ выборок проведён с помощью пакета программ для статистической обработки данных STATA 2.0 (Stata Corp, TX, USA). Корреляционный анализ с вычислением рангового коэффициента корреляции Спирмена выполнен для определения характера взаимоотношений между изучаемыми переменными. Связь между показателями оценивали как сильную при абсолютном значении коэффициента корреляции $r>0,70$; имеющую среднюю силу при r от 0,69 до 0,30 и как слабую при $r<0,29$. Различия между сравниваемыми величинами признавалось достоверным при $p<0,05$.

Результаты. Развитие и течение воспалительного процесса в пародонте, его генерализация и хронизация определяются видовым и количественным составом микрофлоры полости рта, и состоянием иммунного ответа, в том числе ролью системы АМП. Содержание альфа- HNP 1-3 и бета-дефензинов HBD 2 человека достоверно различалось в трёх группах обследованных пациентов. Концентрации HBD 2 у пациентов с хроническим пародонтитом в 1,36 раз превышали показатели группы пациентов с хроническим гингивитом ($p=0,023$) и в 2,39 раз показатели группы контроля ($p<0,001$). Обратная зависимость наблюдалась в отношении HNP 1-3: в группе пациентов с хроническим пародонтитом содержание пептида снижено в 1,23 раза в сравнении с показателями группы пациентов с гингивитом ($p=0,045$) и в 1,97 раз в сравнении с показателями группы контроля ($p<0,001$) (табл. 1).

Уровень секреции кателицидина LL-37 в группе пациентов с хроническим пародонтитом в 1,26 раз превышал показатели группы пациентов с гингивитом ($p=0,04$) и в 1,5 раза показатели группы контроля ($p=0,002$).

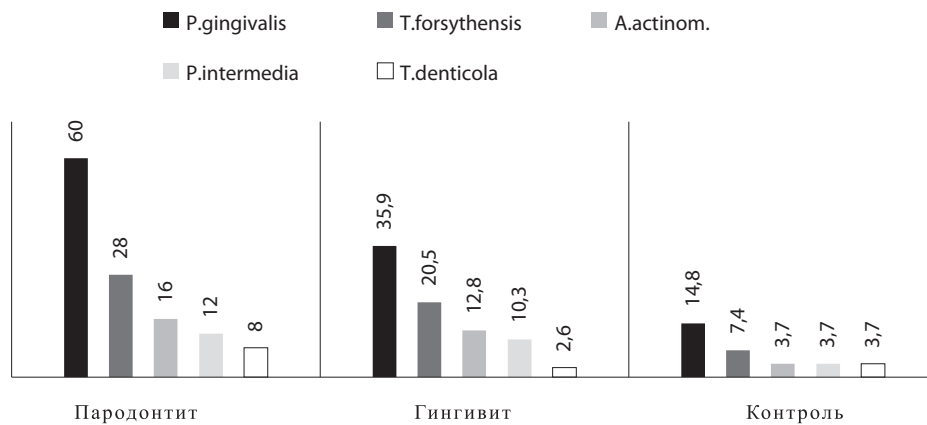
При исследовании уровней содержания АМП у лиц с диагнозом «хронический пародонтит» в под-

Таблица 1

Содержание АМП в смывах ЗДК у лиц с интактным пародонтом, пациентов с хроническим гингивитом и пародонтитом (Me [Q1; Q3]).

АМП	Пародонтит ($n=25$)	Гингивит ($n=39$)	Контроль ($n=27$)	Статистический уровень значимости различий
HNP 1-3 (пг/мл)	497 [418,2; 561,4]	791,1 [734,5; 808,7]	978,3 [934,5; 998,7]	$p_{1-2}=0,045$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}=0,021$
HBD 2 (нг/мл)	19,8 [17,9; 22,1]	14,6 [13,3; 15,4]	8,3 [4,9; 9,2]	$p_{1-2}=0,023$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}=0,034$
LL-37 (нг/мл)	36,2 [32,1; 39,7]	28,7 [20,4; 31,9]	23,9 [19,8; 25,2]	$p_{1-2}=0,2$ $p_{1-3}=0,002$ $p_{2-3}=0,04$

Примечание: достоверность различий между сравниваемыми группами p_{1-2} – группа пациентов с пародонтитом – группа пациентов с гингивитом; p_{1-3} – группа пациентов с пародонтитом – группа контроля; p_{2-3} – группа пациентов с гингивитом – группа контроля.



Частота встречаемости пародонтопатогенных микроорганизмов по группам обследованных (в %).

Таблица 2

Корреляционная матрица антимикробных пептидов в смывах ЗДК и маркеры пародонтопатогенных микроорганизмов зубодесневого кармана

Показатели	HNP 1-3	HBD 2	LL-37
Пародонтит			
<i>P. gingivalis</i>	$r=-0,489$ ($p=0,03$)	$r=0,612$ ($p=0,022$)	$r=0,392$ ($p<0,001$)
<i>T. forsythensis</i>	$r=-0,388$ ($p=0,018$)	$r=0,434$ ($p=0,015$)	$r=0,042$ ($p=0,2$)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	$r=-0,288$ ($p=0,02$)	$r=0,483$ ($p=0,006$)	$r=0,027$ ($p=0,05$)
Ассоциации пародонтопатогенов	$r=-0,388$ ($p=0,031$)	$r=0,189$ ($p=0,05$)	$r=0,112$ ($p=0,2$)
Гингивит			
<i>P. gingivalis</i>	$r=-0,543$ ($p=0,008$)	$r=0,582$ ($p=0,018$)	$r=0,332$ ($p=0,018$)
<i>T. forsythensis</i>	$r=-0,175$ ($p=0,02$)	$r=0,324$ ($p=0,028$)	$r=0,134$ ($p=0,2$)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	$r=-0,134$ ($p=0,08$)	$r=0,251$ ($p=0,057$)	$r=0,158$ ($p=0,02$)
Контроль			
<i>P. gingivalis</i>	$r=-0,482$ ($p=0,02$)	$r=0,134$ ($p=0,06$)	$r=0,179$ ($p=0,2$)
<i>T. forsythensis</i>	$r=-0,424$ ($p=0,03$)	$r=0,017$ ($p=0,26$)	$r=0,12$ ($p=0,08$)

группах с учётом степени тяжести течения заболевания, выявлена следующая особенность: у пациентов с тяжёлой степенью хронического пародонтита уровень секреции HNP 1-3 в 1,2 раза выше такового в подгруппе с лёгким течением (520,7 [501,2;561,4] и 430,8 [418,2; 452,1], соответственно). В отношении секреции других АМП статистически значимых различий в подгруппах не выявлено.

Для установления точек приложения показателей системы АМП, оценены маркеры пародонтопатогенных микроорганизмов зубодесневого кармана (см. рисунок). У пациентов группы с диагнозом хронический пародонтит частота выявления пародонтопатогенных бактерий составила 88,0%. Наиболее часто (60,0%) выявлены маркеры *P. gingivalis*, в 28,0% случаев – *T. forsythensis*, в 16,0% случаев – *A. actinomycetemcomitans*, в 12,0% случаев – *P. intermedia*, в 8,0% случаев – *T. denticola*.

Исследования, проведённые в группе с хроническим гингивитом, показали, что частота выявления носительства пародонтопатогенных видов составила 76,92%. Наиболее часто (35,9%) выявлялись маркеры

P. gingivalis, в 20,5% случаев – *T. forsythensis*, в 12,8% случаев – *A. actinomycetemcomitans*, в 10,3% случаев – *P. intermedia*, в 2,6% случаев – *T. denticola*.

У контрольной группы (с интактным пародонтом) пародонтопатогенная микрофлора выявлена у 9 обследованных (33,3%). При сравнении данных по содержанию АМП с выделением молекулярных маркеров пародонтопатогенных бактерий установлено, что у 7 обследованных группы контроля (25,9%) с помощью ПЦР-диагностики выявлена маркёрная ДНК одного пародонтопатогенного вида и у 2 обследованных (7,4%) – двух видов. Среди выделенных пародонтопатогенов наиболее часто встречались маркеры *P. gingivalis* (14,8%), в 7,4% случаев – *T. forsythensis*, в 3,7% случаев – *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. denticola*. Высокое содержание альфа-дефензинов отделяемого зубодесневого кармана у лиц контрольной группы имело интересную особенность: внутри подгруппы с выявленными пародонтопатогенами в исследуемых участках зубодесневой борозды содержание HNP 1-3 было почти в 2 раза выше в сравнении с обследо-

ными контрольной группы с отрицательным результатом ПЦР-диагностики пародонтопатогенов.

Для более глубокого патогенетического анализа взаимосвязей между выявленными видами пародонтопатогенов и содержанием АМП зубодесневой жидкости, проведён корреляционный анализ полученных данных (табл. 2). В группе пациентов с хроническим пародонтитом установлена умеренно выраженная корреляционная зависимость содержания HBD 2 с определением следующих пародонтопатогенов: *P. gingivalis* ($r=0,612$, $p=0,022$), *T. forsythensis* ($r=0,434$, $p=0,015$), *A. actinomycetemcomitans* ($r=0,483$, $p=0,006$). Отмечены положительные корреляции слабой степени между содержанием LL-37 и выделением пародонтопатогена *P. gingivalis* ($r=0,392$, $p<0,001$). Установлена умеренная отрицательная корреляция между содержанием HNP 1-3 и выделением пародонтопатогенов в ассоциациях (*P. gingivalis* с *T. forsythensis* и *T. denticola*) ($r=-0,388$, $p=0,031$). В группе пациентов с хроническим гингивитом установлены схожие с группой пародонтита прямые корреляции, однако меньшие по своей силе: содержание HBD 2 с *P. gingivalis* ($r=0,582$, $p=0,018$), *T. forsythensis* ($r=0,324$, $p=0,028$), содержание LL-37 с *P. gingivalis* ($r=0,332$, $p=0,018$), отрицательная корреляция в содержании HNP 1-3 с выделением пародонтопатогена *P. gingivalis* ($r=-0,543$, $p=0,008$).

У обследованных контрольной группы выявлены корреляции внутри системы АМП: отрицательная корреляция средней степени силы между содержанием альфа- и бета-дефензинов ($r=-0,473$, $p=0,034$), положительная корреляция слабой степени между содержанием бета-дефензинов и кателицидина ($r=0,343$, $p=0,008$). Высокое содержание HNP 1-3 обратно коррелировало с выделением *P. gingivalis* ($r=-0,482$, $p=0,02$) и *T. forsythensis* ($r=-0,424$, $p=0,03$).

Обсуждение. Ведущая роль в развитии и прогрессировании воспалительных заболеваний пародонта принадлежит микробному фактору: процессы воспаления десны сопровождаются видовыми и количественными изменениями микробиоценоза десневой борозды, в том числе выделением пародонтопатогенных бактерий [20, 21]. Маркёры пародонтопатогенных микроорганизмов в отделяемом зубодесневого кармана выявлены у преобладающего большинства (88%) пациентов с хроническим пародонтитом и у большей части обследованных с гингивитом (76,92%), что отражает развитие воспалительной реакции со стороны соединительной ткани, ведёт к нарушению целостности зубодесневого эпителия, вызывая впоследствии образование глубоких пародонтальных карманов и способствуя дальнейшей колонизации пародонтопатогенных бактерий I и II порядка. У большинства обследованных группы контроля (66,7%) с интактным пародонтом маркёры пародонтопатогенных бактерий не выявлены.

Обнаруженные в зубодесневых карманах бактерии *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. intermedia* отличаются высокими инвазивными, адгезивными и токсическими свойствами по отношению к тканям пародонта. Наличие данных

пародонтопатогенов и продуктов их жизнедеятельности, факторов агрессии и эндотоксинов ведёт к снижению защитных свойств десневой жидкости, приводя к снижению местного иммунитета [22].

Десневая жидкость является физиологической средой полости рта, участвуя в процессах регенерации и репарации тканей пародонта, регуляции иммунного ответа за счёт содержащихся в ней лейкоцитов, медиаторов воспаления, ферментов, минеральных веществ, растворимых белковых фракций, включая систему АМП [23]. Первичный патогенетический механизм антимикробной активности системы АМП основан на электростатическом взаимодействии с отрицательно-заряженными мембранными молекулами. В клетках-мишенях АМП могут проявлять антимикробную активность за счёт транслокации клеточной мембраны и ингибирования основных клеточных процессов, включая синтез нуклеиновых кислот, синтез клеточной стенки, синтез белка и ферментативную активность бактерий [24].

Содержание альфа-дефензинов у пациентов с хроническим пародонтитом и гингивитом значительно снижено по сравнению с обследованными группы контроля. Это может отражать значительное расходование запасов пептида в ходе иммунных реакций, направленных на элиминацию пародонтопатогенов, что находит отражение в выявленных отрицательных корреляциях средней степени силы. Концентрации HBD 2 и LL-37 выше у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта в сравнении с группой контроля.

Возможно, именно расходование HNP 1-3 идёт первоочередно: молекулы данного АМП накапливаются на поверхности пародонтопатогенов за счёт электростатических связей, затем взаимодействуют с анионными группировками фосфолипидов клеточной стенки бактерий с последующим образованием оболочечных пор и гибелью бактерии, наряду с проникновением их внутрь патогена и ингибированием синтеза ДНК, ферментов-репарантов клеточной стенки, шаперонов и рибосом. Выявленная разница в концентрациях исследуемых АМП, возможно, характеризует реципрокное взаимоотношение между уровнями секреции HNP 1-3 с HBD 2 и LL-37 при воспалительных заболеваниях пародонта.

Особенностью явилось повышенное содержание HNP 1-3 в подгруппе пациентов с тяжёлой степенью тяжести генерализованного пародонтита в сравнении с лёгким его течением: вероятно, длительное воспаление десны, вызванное колонизацией пародонтопатогенными бактериями *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis*, приводящее к дестабилизации целостности эпителиальных тканей полости рта характеризуется повышенным синтезом пептида. Такой иммунный дисбаланс может свидетельствовать о двойственной роли альфа-дефензинов в развитии хронических воспалительных процессов пародонта [13].

Выявленная особенность содержания альфа-дефензинов в контрольной группе свидетельствует о том, что, вероятно, присутствуя в микробиоте полости рта в небольшом количестве, эндотоксины па-

родонтопарогенных бактерий активируют местный иммунитет путём модуляции синтеза АМП HNP 1-3, являясь своеобразными модуляторами микробной природы, при этом в целом не снижая расходование запасов пептида.

При воспалительных заболеваниях пародонта изменяются процессы синтеза альфа- и бета-дефензинов, кателицидина в десневой жидкости, что, вероятно, обусловлено колонизацией значимых пародонтопатогенных бактерий, их инвазивными, адгезивными, токсическими свойствами по отношению к тканям пародонта. Взаимосвязи маркённых пародонтопатогенов с уровнями секреции АМП отражают сдвиги в процессах репаративной регенерации слизистой оболочки ротовой полости и регуляции местного иммунитета в ответ на микробную инвазию.

Показатели системы АМП могут применяться в комплексной оценке состояния полости рта при воспалительных заболеваниях пародонта. Учитывая двойственность содержания пептидов и значительные индивидуальные различия в составе десневой жидкости, целесообразным является применение многокомпонентных панелей, дающих возможность анализа более широкого спектра факторов воспаления.

Финансирование. Работа поддержана проектом «Норвежско-российские связи в области антимикробного управления в стоматологической практике в Приполярной области» (руководитель проекта – доцент института клинической стоматологии Арктического университета Норвегии (г. Тромсе) Мухаммед Ал Харони).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5-17, 19-22, 24 см. REFERENCES)

1. Дудникова Э.В., Бадьян А.С. Роль дефензинов в развитии патологического процесса: новые подходы к диагностике и лечению. *Медицинский вестник Юга России*. 2015; 2: 9-14.
3. Алиева М.С., Расулов И.М., Магомедов М., Мейланова Р.Д. Современные аспекты этиологии и патогенеза пародонтита. *Известия Дагестанского государственного педагогического университета. Естественные и точные науки*. 2013; 1(22): 25-9.
4. Локтионов А.Л., Конопля А.И., Лунёв М.А., Караулов А.В. Иммунонные и оксидантные нарушения в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта. *Иммунология*. 2015; 36(5): 319-28.
18. Блашкова С.Л., Мустафин И.Г., Халиуллина Г.Р. Роль эндогенных антимикробных пептидов в развитии воспалительных заболеваний пародонта у пациентов, находящихся на ортодонтическом лечении. *Фундаментальные исследования*. 2014; 4(3):461-5.
23. Мудров В.П., Нелюбин В.Н., Воробьёва Е.С., Лысюк Е.Ю., Мяндиёв М.С., Фоменков И.С. и др. Применение ростовых факторов в терапии пародонтита. *Медицинская иммунология*. 2018; 20(3):439-44.

REFERENCES

1. Dudnikova E.V., Bad'yan A.S. The role of defensins in the development and pathological process: new approaches to diagnosis and treatment. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii*. 2015; 2: 9-14. (in Russian)
2. Kipiani N.V., Ivereli M., Mosemgvlishvili N., Kipiani N.V., Jafaridze S. Parodontitis pathogenetic factors, their interaction and effects. *Georgian Med. News*. 2014; 228:88-91.
3. Alieva M. S., Rasulov I. M., Magomedov M., Mejlanova R. D. Modern aspects of the etiology and pathogenesis of periodontitis. *Izvestiya*

- Dagestanskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta. Estestvennye i tochnye nauki*. 2013; 1(22): 25-9. (in Russian)
4. Loktionov A. L., Konoplya A. I., Lunev M. A., Karaulov A. V. Immune and oxidative disorders in the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *Immunologiya*. 2015; 36(5): 319-28. (in Russian)
5. van Winkelhoff A.J., Abbas F. Serie: Medicamenten en mondzorg. Is er nog indicatie voor bacteriologisch onderzoek bij parodontitis? [Medicaments and oral care: Is there still a rationale for clinical periodontal microbiology?]. *Ned. Tijdschr Tandheelkd*. 2018; 125(10):525-30.
6. Gupta S., Bhatia G., Sharma A., Saxena S. Host defense peptides: An insight into the antimicrobial world. *J. Oral Maxillofac Pathol*. 2018; 22(2):239-44.
7. Mallapragada S., Wadhwa A., Agrawal P. Antimicrobial peptides: The miraculous biological molecules. *J. Indian Soc. Periodontol*. 2017; 21(6): 434-8.
8. Mahlapuu M., Håkansson J., Ringstad L., Björn C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect. Microbiol*. 2016; 27(6):194.
9. Hans M., Madaan H.V. Epithelial antimicrobial peptides: guardian of the oral cavity. *Int. J. Pept*. 2014; 2014:370297.
10. Ji S., Choi Y. Point-of-care diagnosis of periodontitis using saliva: technically feasible but still a challenge. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2015; 5:65.
11. Gursoy U.K., Könönen E., Pussinen P. Use of host- and bacteria-derived salivary markers in detection of periodontitis: a cumulative approach. *Dis. Markers*. 2011; 30: 299-305.
12. Streckfus C., Bigler L. The use of soluble, salivary c-erbB-2 for the detection and post-operative follow-up of breast cancer in women: the results of a five-year translational research study. *Adv. Dent. Res*. 2005; 18: 17-24.
13. Jourdain M.L., Velard F., Pierrard L., Sergheraert J., Gangloff S.C., Baux J. Cationic antimicrobial peptides and periodontal physiopathology: A systematic review. *J. Periodontal. Res*. 2019; 54(6):589-600.
14. Hoare A., Soto C., Rojas-Celis V., Bravo D. Chronic Inflammation as a Link between Periodontitis and Carcinogenesis. *Mediators Inflamm*. 2019; 27; 2019:1029857.
15. Enigk K., Jentsch H., Rodloff A. C. Eschrich K., Stingu C. S. Activity of five antimicrobial peptides against periodontal as well as non-periodontal pathogenic strains. *J. Oral Microbiol*. 2020; 12(1):1829405.
16. Drisko C.L. Periodontal debridement: still the treatment of choice. *J. Evid. Based Dent. Pract*. 2014; 14 Suppl.:33-41.
17. Li S., Schmalz G., Schmidt J., Krause F., Haak R., Ziebolz D. Antimicrobial peptides as a possible interlink between periodontal diseases and its risk factors: A systematic review. *J. Periodontal. Res*. 2018; 53(2):145-55.
18. Blashkova S.L., Mustafin I.G., Khaliullina G.R. The role of endogenous antimicrobial peptides in the development of inflammatory periodontal diseases in patients under orthodontic treatment. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 4(3):461-5. (in Russian)
19. Al-Shammari N.M., Shafshak S.M., Ali M.S. Effect of 0.8% Hyaluronic Acid in Conventional Treatment of Moderate to Severe Chronic Periodontitis. *J. Contemp. Dent. Pract*. 2018; 19(5):527-34.
20. Meghil M. M., Cutler C. W. Oral Microbes and Mucosal Dendritic Cells, "Spark and Flame" of Local and Distant Inflammatory Diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 28;21(5):1643.
21. Ibberson C. B., Whiteley M. The social life of microbes in chronic infection. *Curr. Opin Microbiol*. 2020; 53:44-50.
22. Curtis M.A., Diaz P.I., Van Dyke T.E. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol*. 2000. 2020; 83(1):14-25.
23. Mudrov V.P., Nelyubin V.N., Vorob'eva E.S., Lysyuk E.Yu., Myandiev M.S., Fomenkov I. S. et al. Application of growth factors in the treatment of periodontitis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2018; 20(3):439-44. (in Russian)
24. Cardoso E.M., Reis C., Manzaneres-Cespedes M.C. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. *Postgrad Med*. 2018; 130(1):98-104.

Поступила 15.03.21
Принята к печати 24.04.21

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Борисова О.Ю.¹, Гадуа Н.Т.¹, Пименова А.С.¹, Шепелин А.П.², Полосенко О.В.², Требунских И.П.³, Сидорова Н.А.³, Борисова А.Б.¹, Миронов А.Ю.¹, Афанасьев С.С.¹

ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ПЕРВИЧНОГО ПОСЕВА ПРИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ДИФТЕРИИ

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

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Московская область, пос. Оболensk, Россия;

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» Роспотребнадзора, 129626, г. Москва, Россия

Цель работы – оценка культуральных и морфологических свойств клинически значимых видов коринебактерий на средах первичного посева при культуральной диагностике дифтерии. Использовано 9 питательных сред для первичного посева исследуемого материала на дифтерию: питательная среда для выделения коринебактерий (Коринебакагар); основы для приготовления кровяных теллуритовых питательных сред – Питательная среда № 1 ГРМ, Питательный агар для культивирования микроорганизмов (ГРМ агар), Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам – среда АГВ, Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (СПА), среда Клауберга II, Hoyle Medium agar (Oxoid), Blood agar base (Conda), Columbia Agar Base (Conda). Использовано 7 тест-штаммов микроорганизмов из Государственных коллекций патогенных микроорганизмов – C. diphtheriae биоваров gravis, mitis, intermedius, belfanti и подвида lausannense, C. ulcerans, C. pseudotuberculosis. Исследования проведены в соответствии с МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции». Описаны культурально-морфологические свойства штаммов на всех испытываемых питательных средах первичного посева через 24 и 48 часов инкубации. Анализ результатов по основным ростовым свойствам питательных сред показал, что все питательные среды обладали высокой чувствительностью – из разведения 10^{-7} в отношении всех испытываемых штаммов. На питательных средах визуально обнаружены колонии коринебактерий уже через 19-20 часов культивирования. При культивировании взвеси коринебактерий из разведения 10^{-6} на питательных средах количество колоний составило от 95 ± 5 до 120 ± 10 . Заключение. Все питательные среды обладают дифференциально-диагностическими свойствами, обеспечивающими рост коринебактерий уже через сутки инкубации посевов.

Ключевые слова: C. diphtheriae; бактериологическая диагностика; среды первичного посева; колонии; культурально-морфологические свойства.

Для цитирования: Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Шепелин А.П., Полосенко О.В., Требунских И.П., Сидорова Н.А., Борисова А.Б., Миронов А.Ю., Афанасьев С.С. Возможности практического применения разных питательных сред для первичного посева при лабораторной диагностике дифтерии. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (7): 428-437. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-428-437>

Borisova O.Yu.¹, Gadua N.T.¹, Pimenova A.S.¹, Shepelin A.P.², Polosenko O.V.², Trebunskikh I.P.³, Sidorova N.A.³, Borisova A.B.¹, Mironov A.Yu.¹, Afanasiev S.S.¹

POSSIBILITIES OF PRACTICAL APPLICATION OF DIFFERENT CULTURE MEDIUMS FOR LABORATORY DIAGNOSTIC OF DIPHTHERIA

¹G. N. Gabrichevsky Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russian Federation;

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Moscow region, Obolensk, Russian Federation;

³Center of Hygiene and Epidemiology in Moscow, 129626, Moscow, Russia

The purpose of the work is to evaluate the cultural and morphological properties of colonies of clinically significant corynebacteria on culture mediums for the isolation of corynebacteria. The study used 9 culture mediums for the isolation of corynebacteria: a culture medium for the isolation of corynebacteria (Corynebacaagar); Tellurite-containing blood agars on base – Culture medium № 1 GRM, Culture agar for the cultivation of microorganisms (GRM agar), Culture medium for determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial preparations – AGV, culture agar for the cultivation of dry microorganisms (SPA), Clauber medium II, Hoyle Medium agar (Oxoid), Blood agar base (Conda), Columbia Agar Base (Conda). The work used 7 test strains of microorganisms from the State collections of pathogenic microorganisms – C. diphtheriae biovars gravis, mitis, intermedius, belfanti and subspecies lausannense, C. ulcerans and C.pseudotuberculosis. Studies were carried out in accordance with MUK 4.2.3065-13 «Laboratory diagnosis of diphtheria infection». We describe culture-morphological properties of strains on all tested culture mediums the isolation of corynebacteria after 24 and 48 hours of incubation. Analysis of the results on the growth properties of culture mediums showed that all culture mediums had high sensitivity – from dilution 10^{-7} for all test strains. Colonies of corynebacteria were visually detected on culture mediums after 19-20 hours of cultivation. When cultivating a suspension of corynebacteria from breeding 10^{-6} on culture mediums, the number of colonies ranged from

95±5 to 120±10. Conclusion. All culture mediums had differential diagnostic properties that ensure the growth of corynebacteria after the day of incubation.

Key words: *C. diphtheriae*; bacteriological diagnosis; culture mediums for the isolation of corynebacteria; colonies; culture-morphological properties.

For citation: Borisova O.Yu., Gadua N.T., Pimenova A.S., Shepelin A.P., Polosenko O.V., Trebunskich I.P., Sidorova N.A., Borisova A. B., Mironov A.Yu., Afanasiev S.S. Possibilities of practical application of different culture mediums for laboratory diagnostic of diphtheria. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (7): 428-437 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-428-437>

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

Information about authors:

Borisova O.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6316-5046>;
Gadua N.T., <https://orcid.org/0000-0001-6247-6176>;
Pimenova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6914-3531>;
Shepelin A.P., <http://orcid.org/0000-0002-8253-7527>;
Polosenko O.V., <http://orcid.org/0000-0001-5961-9041>;
Borisova A.B., <https://orcid.org/0000-0003-4425-8428>;
Mironov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;
Afanasiev S.S., <https://orcid.org/0000-0001-6497-1795>.

Acknowledgment. The work was carried out within the sectoral program of Rospotrebnadzor.

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

Received 27.04.2021
Accepted 10.05.2021

Введение. Эпидемические вспышки и спорадические случаи заболеваемости дифтерией фиксируются на протяжении многих десятилетий. Дифтерия являлась основной причиной детской смертности до наступления эпохи вакцинации. Масштабное применение вакцины против дифтерии в рамках плановых программ иммунизации помогло элиминировать это инфекционное заболевание в большинстве стран мира.

Внушает беспокойство возвращение дифтерии в страны, где население недостаточно охвачено медико-санитарной помощью [1–3]. Наиболее тяжёлое положение сложилось в Венесуэле, Йемене, Бангладеш (Кокс-Базаре), где интенсивный рост заболеваемости дифтерией начался в 2017 году. На население Венесуэлы пришлось 80% всех зарегистрированных случаев дифтерии в Латинской Америке. Несмотря на проводимую в настоящее время властями Венесуэлы вакцинацию населения, в 2018 г. зарегистрировано 1,2 тыс. случаев заболеваний дифтерией, из них более 80 случаев закончились летальным исходом. На Гаити зафиксировано порядка 250 случаев заболеваний, из которых 3 случая закончились летально. В Колумбии в указанный период зарегистрировано около 10 случаев заболеваний, связанных с вынужденной миграцией населения из стран, где регистрируются случаи заболевания дифтерией [1–3].

По данным Роспотребнадзора в Российской Федерации регистрируются единичные случаи заболеваемости дифтерией [4–8]. В 2017 году заболевших дифтерией лиц не зарегистрировано, в Самарской и Челябинской областях выявлено 2 бактерионосителя; в 2018 г. – зарегистрировано 4 случая заболевания (ХМАО-Югра, Новосибирская область, республика Северная Осетия-Алания) и 3 случая бактерионосительства (ХМАО-Югра), в 2019 г. – зарегистрирован-

но 5 случаев заболевания (ХМАО-Югра) и 2 случая бактерионосительства (ХМАО-Югра), в 2020 г. – 1 случай заболевания (ХМАО-Югра). Несмотря на резкое снижение заболеваемости дифтерией за последние десятилетия, данные генотипирования свидетельствуют о продолжающейся циркуляции возбудителя дифтерии на территории России – выявлены токсигенные штаммы трёх сиквенс-типов – ST25, ST8, ST67, которые входят в различные клональные комплексы и являются широко распространёнными в мире. Штаммы сиквенс-типа ST25 регистрируют на территории России, начиная с 1960-х годов по настоящее время, штаммы ST8 зарегистрированы на территории России только в 1980-е годы, вызвали эпидемический подъём заболеваемости дифтерией в 1990-х годах и до сих пор выделяются на территории нашей страны, штаммы ST67 зарегистрированы, начиная с 2012 г. [9].

Возбудитель дифтерии – *Corynebacterium diphtheriae*, продуцирующий дифтерийный токсин (экзотоксин). Источником инфекции является больной или бактерионоситель токсигенных штаммов *C. diphtheriae*. Основной механизм передачи – аэрозольный, реже контактный; механизмы передачи – воздушно-капельный и контактно-бытовой. Нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae* не вызывают дифтерийную инфекцию. Вместе с тем, данные микроорганизмы могут выделяться при фарингите, артрите, эндокардите и других гнойно-воспалительных заболеваниях [10 – 12]. Таксономически близкими к виду *C. diphtheriae* являются *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis* – патогены крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, домашних животных, способные вырабатывать дифтериеподобный экзотоксин и вызывать заболевания у человека. Известны случаи выделения токсигенных штаммов *C. ulcerans* при

клинической картине заболевания, сходной с дифтерией (дифтериеподобное заболевание), токсигенных штаммов *C. pseudotuberculosis*, вызывающих лимфадениты [13 – 15].

Культуральный метод при лабораторной диагностике дифтерийной инфекции является ведущим [16]. Культуральное исследование проводят с целью лабораторной диагностики дифтерийной инфекции, выявления источников возбудителя инфекции, подтверждения эпидемиологических связей и наблюдения за циркуляцией токсигенных штаммов *C. diphtheriae* в соответствии с СП 3.1.2.3109-13 «Профилактика дифтерии» и МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Умение выделять коринеформные микроорганизмы (*Corynebacterium* spp.) служит критерием оценки качества работы бактериологических лабораторий, особенно в период снижения и спорадической заболеваемости дифтерией.

Использование высококачественных питательных сред составляет залог успеха микробиологических исследований, в том числе и при проведении исследований на дифтерию. Современная микробиология без питательных сред существовать не может, их качество во многом определяет информативность и точность микробиологического исследования. Выбор или разработка новых питательных сред для культивирования микроорганизмов основываются на точном знании биологических свойств каждого конкретного вида микроорганизма. Целью культурального исследования является выделение и идентификация возбудителя с применением минимального количества диагностических тестов, необходимых, достаточных и специфичных для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки.

Для выделения коринебактерий из исследуемого материала в практике здравоохранения используют селективные дифференциально-диагностические кровяные теллуриновые среды лабораторного приготовления – кровяной теллуриновый агар, среда Клауберга II. В качестве основы этих питательных сред используют различные агаровые основы, в которые *ex tempore* добавляют кровь для стимуляции роста культур коринебактерий, теллурит калия для подавления роста сопутствующей микрофлоры. Коринебакагар (КБА) широко используется в практике российских бактериологических лабораторий, поскольку он не требует внесения крови, так как в составе среды содержится стимулятор роста гемофильных микроорганизмов (СРГМ). Оригинальная технология приготовления препарата позволяет сохранить биологические свойства крови [17].

Цель работы – оценка культуральных и морфологических свойств клинически значимых видов коринебактерий на средах первичного посева при культуральной диагностике дифтерийной инфекции.

Материал и методы. Изучено 9 питательных сред, используемых на территории РФ для первичного посева исследуемого материала при исследовании на дифтерию: питательная среда для выделения коринебактерий (Коринебакагар) (ФСР 2007/00003);

кровяные теллуриновые питательные среды, где в качестве основ для их приготовления применены: Питательная среда для количественного определения микробной загрязненности «Питательная среда № 1 ГРМ» (ФСР 2011/11415), Питательный агар для культивирования микроорганизмов (ГРМ-агар) (ФСР 2007/00001), Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам – среда АГВ (ФСР 2012/13687), Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (СПА) (ФСР 2008/02386), Среда Клауберга II, Hoyle Medium agar (Oxoid, Великобритания), Основа кровяного агара (Conda, Испания), Columbia Agar Base (Conda, Испания). В кровяные теллуриновые среды добавлена кровь крупного рогатого скота («Лейтран», Москва) и 2% теллурит калия (МиниМед РУ № ФСР 2009/05371). Все использованные в исследовании питательные среды приготовлены в соответствии с инструкциями производителей и МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Использованы 7 тест-штаммов микроорганизмов из Государственных коллекций патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» и ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ – *C. diphtheriae* биовар *gravis* № 665, *C. diphtheriae* биовар *mitis* № B-8628, *C. diphtheriae* биовар *belfanti* № B-8635, *C. diphtheriae* подвид *lausannense* № B-8755, *C. diphtheriae* биовар *intermedius* № 090093 (7227), *C. ulcerans* № 675, *C. pseudotuberculosis* № B-8640. Все тест-штаммы микроорганизмов типичны по своим культуральным, морфологическим, тинкториальным, биохимическим свойствам.

В соответствии с МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» суточные культуры штаммов, выращенные на 10% сывороточном агаре, смывали изотоническим раствором натрия хлорида. Готовили исходную взвесь каждой культуры (пробирка № 0): мутность полученной суспензии соответствовала 10 ед. оптического стандарта мутности (ОСО 42-28-85 П), что условно соответствует 1 млрд бактериальных клеток в 1 мл взвеси. Из исходных взвесей культур (пробирки № 0) готовили серийные разведения в изотоническом растворе натрия хлорида (табл. 1).

Из двух последних разведений (пробирки № 6 и № 7) по 0,1 мл суспензии культур бактерий вносили в две чашки с испытуемыми средами первичного посева, досуха втирали круговыми движениями при помощи шпателя. Посевы помещали в термостат, инкубировали 24-48 ч при температуре $+37\pm 1^\circ\text{C}$. Культуральные свойства выросших колоний оценивали с помощью стереоскопического микроскопа SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss, Германия) (объектив PlanApo S 1,0× FWD 60 мм; окуляр PI 10x23 Br foc) и фотографировали.

Результаты. Описаны культуральные и морфологические свойства 7 штаммов: *C. diphtheriae* биовар *gravis*, *C. diphtheriae* биовар *mitis*, *C. diphtheriae* биовар *belfanti*, *C. diphtheriae* биовар *intermedius*, *C. diphtheriae* подвид *lausannense*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, выросших на 9 плотных питательных

Таблица 1

Приготовление разведений культур

№ пробирки	Количество физ. раствора, мл	Объём вносимой суспензии, мл	Условное количество микробных клеток в 1 мл взвеси
1	1,0	1,0 из исходной взвеси	5×10^8
2	4,5	0,5 из 1-й пробирки	5×10^7
3	4,5	0,5 из 2-й пробирки	5×10^6
4	4,5	0,5 из 3-й пробирки	5×10^5
5	4,5	0,5 из 4-й пробирки	5×10^4
6	4,5	0,5 из 5-й пробирки	5×10^3
7	2,0	0,5 из 6-й пробирки	10^3

средах первичного посева: кровяных теллуритовых средах, приготовленных на основе – ГРМ агара, Питательной среды № 1 ГРМ, среды Клауберга II, сухого питательного агара (СПА), Blood agar base,

Columbia Agar Base, Hoyle Medium agar, среды АГВ; и на Коринебакагаре. Культуральные и морфологические свойства описывали через 24 и 48 часов инкубации (табл. 2).

Таблица 2

Культуральные свойства клинически значимых коринебактерий на плотных питательных средах первичного посева при просмотре в стереоскопическом микроскопе

Микроорганизмы	Время инкубации посевов	
	24 часа	48 часов
КТА на основе ГРМ агара		
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>gravis</i>	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, начинает формироваться выпуклость центра колонии, лёгкая изрезанность края, маслянистые, слегка шероховатые, диаметром 1,5-2 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, приподнятые с выпуклым центром, слегка шероховатые, диаметром 2-3 мм, имеют радиальную исчерченность (форма «маргаритки») или выраженную краевую изрезанность, часто крошатся при прикосновении
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>mitis</i> и биовар <i>belfanti</i> , подвида <i>lausannense</i>	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, иногда могут быть плоскими, мягкой, маслянистой консистенции, с ровным краем, слегка шероховатые, диаметром 1-1,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, приподнятые, но могут остаться плоскими, слегка шероховатые, мягкой, маслянистой консистенции или могут крошиться при прикосновении, с ровным краем, диаметром 1,5-2 мм
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>intermedius</i>	Колонии имеют серо-чёрную окраску, мелкие, плоские, мягкой, маслянистой консистенции, диаметром 0,3-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, мелкие, плоские, гладкие, с ровным краем, мягкой, маслянистой консистенции, диаметром 0,5-1,0 мм
<i>C. ulcerans</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, с ровным краем, маслянистые, диаметром 0,3-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную или чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, выпуклые или приподнятые с выпуклым центром, мягкой, маслянистой консистенции, может быть лёгкая изрезанность края, диаметром 1-2 мм
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Колонии имеют серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, с ровным краем, маслянистые, диаметром 0,3-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, с ровным краем, маслянистые, диаметром 0,8-1,0 мм

Продолжение табл. 2 см. на стр. 432.

Микроорганизмы	Время инкубации посевов	
	24 часа	48 часов
КТА на основе Питательной среды № 1 ГРМ		
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>gravis</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, начинает формироваться выпуклость центра колонии, лёгкая изрезанность края, маслянистые, слегка шероховатые, слегка крошатся при прикосновении, диаметром 1,5-2 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, приподнятые с выпуклым центром, слегка шероховатые, диаметром 2-3 мм, имеют радиальную исчерченность (форма «маргаритки») или выраженную краевую изрезанность, часто крошатся при прикосновении
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>mitis</i> и биовар <i>belfanti</i> , подвид <i>lausannense</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, иногда могут быть плоскими, мягкой, маслянистой консистенции, с ровным краем, слегка шероховатые, диаметром 1-1,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, приподнятые, но могут остаться плоскими, слегка шероховатые, мягкой, маслянистой консистенции или могут крошиться при прикосновении, с ровным краем, диаметром 1,5-2 мм
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>intermedius</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, мелкие, плоские, мягкой, маслянистой консистенции, диаметром 0,3-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, мелкие, плоские, гладкие, с ровным краем, мягкой, маслянистой консистенции, диаметром 0,5-1,0 мм
<i>C. ulcerans</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, слегка выпуклые, с ровным краем, маслянистые, диаметром 0,5-0,7 мм	Колонии имеют серо-чёрную или чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, выпуклые или приподнятые с выпуклым центром, мягкой, маслянистой консистенции, с ровным краем, диаметром 1-2 мм
<i>C.pseudotuberculosis</i>	Колонии имеют серую окраску, округлые, непрозрачные, с ровным краем, маслянистые, диаметром 0,5-0,7 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, с ровным краем, маслянистые, диаметром 0,8-1,0 мм
КТА на основе СПА		
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>gravis</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, начинает формироваться выпуклость центра колонии, лёгкая изрезанность края, маслянистые, слегка шероховатые, слегка крошатся при прикосновении, диаметром 1,5-2 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, приподнятые с выпуклым центром, шероховатые, диаметром 2-4 мм, имеют радиальную исчерченность (форма «маргаритки») или выраженную краевую изрезанность, часто крошатся при прикосновении
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>mitis</i> и биовар <i>belfanti</i> , подвид <i>lausannense</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, маслянистой консистенции, с ровным краем, слегка шероховатые, диаметром 1-1,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, приподнятые, но могут остаться плоскими, слегка шероховатые, мягкой, маслянистой консистенции или могут крошиться при прикосновении, с ровным краем, диаметром 2-3 мм
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>intermedius</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, мелкие, плоские, мягкой консистенции, диаметром 0,3-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, мелкие, плоские, гладкие, с ровным краем, мягкой, маслянистой консистенции, диаметром 0,8-1,0 мм
<i>C. ulcerans</i>	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, слегка выпуклые, с ровным краем, блестящие, маслянистые, диаметром 0,5-0,8 мм	Колонии имеют серо-чёрную или чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, выпуклые или приподнятые с выпуклым центром, мягкой, маслянистой консистенции, с ровным краем, диаметром 1-2 мм
<i>C.pseudotuberculosis</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, с ровным краем, маслянистые, диаметром 0,5-0,8 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, с ровным краем, маслянистые, диаметром 0,8-1,0 мм

Продолжение табл. 2 см. на стр. 433.

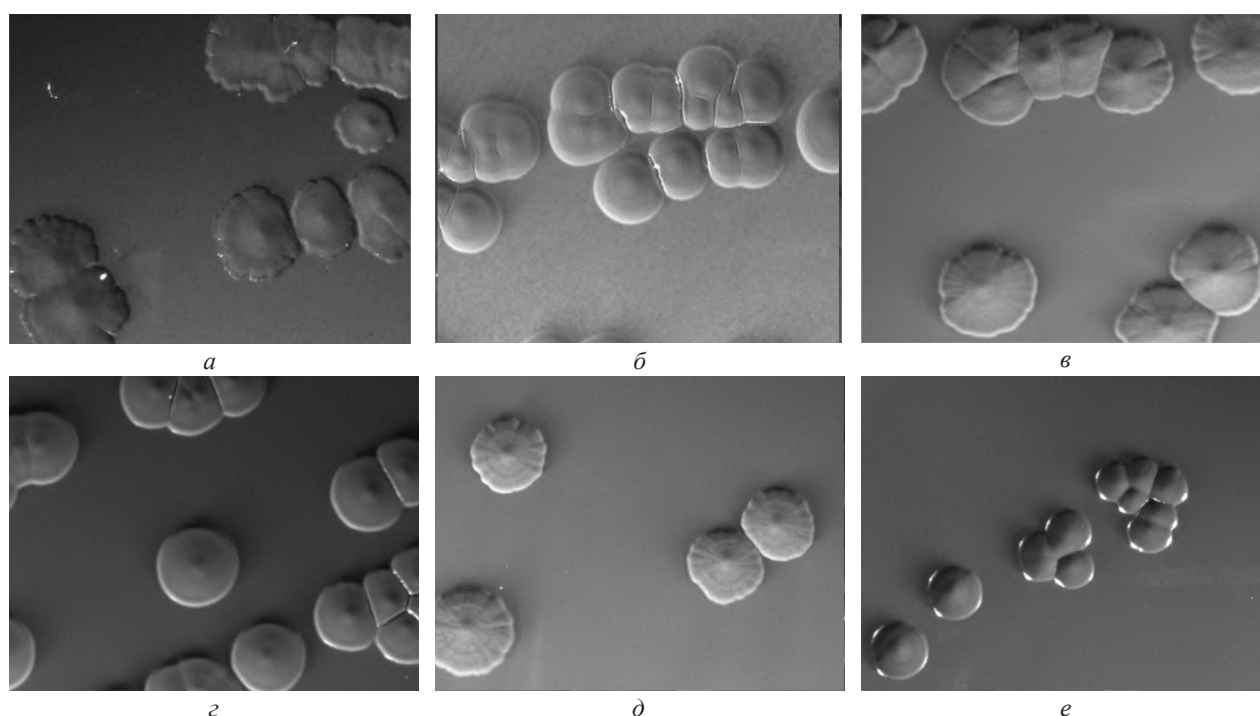
Микроорганизмы	Время инкубации посевов	
	24 часа	48 часов
Среда Клауберга II		
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>gravis</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные с блестящей поверхностью, слегка приподнятые, начинает формироваться выпуклость центра колонии, лёгкая изрезанность края, иногда может просматриваться светлая периферия, маслянистые, иногда крошатся при прикосновении или имеют «водянистую» консистенцию, чаще мелкие, диаметром до 0,5-1 мм	Колонии имеют серо-чёрную или черную окраску округлые, непрозрачные, матовые, приподнятые с выпуклым центром, шероховатые, иногда наблюдаются «гигантские» плоские колонии, диаметр колоний увеличивается в 2-3 раза и через 48 ч может достигать до 2-4 мм, имеют радиальную исчерченность (форма «маргаритки») или выраженную краевую изрезанность, может просматриваться тонкая светлая периферия, крошатся при прикосновении, часто расположены группами по несколько сливающихся колоний в виде «гусеницы»
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>mitis</i> и биовар <i>belfanti</i> , подвид <i>lausannense</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, маслянистой консистенции, с ровным краем, слегка шероховатые, диаметром 1-1,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, приподнятые, но могут остаться плоскими, слегка шероховатые, мягкой, маслянистой консистенции или могут крошиться при прикосновении, с ровным краем, диаметром 2-3 мм
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>intermedius</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, мелкие, плоские, мягкой консистенции, диаметром 0,3-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, мелкие, плоские, гладкие, с ровным краем, мягкой, маслянистой консистенции, диаметром 0,8-1,0 мм
<i>C. ulcerans</i>	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, слегка выпуклые, с ровным краем, блестящие, маслянистые, иногда может просматриваться светлая периферия, диаметром 0,4-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску или чёрную окраску, с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, выпуклые или приподнятые с выпуклым центром, мягкой, маслянистой консистенции, с ровным краем, иногда может просматриваться светлая периферия, диаметром 1-2 мм
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, с ровным краем, блестящие, диаметром 0,5-0,8 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, с ровным краем, шероховатые, могут крошиться при прикосновении, диаметром 0,8-1,0 мм
Коринебакага (КБА)		
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>gravis</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, несколько уплощены со слегка неровными краями, слегка шероховатые, диаметром не менее 0,6 мм	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, со складчатой поверхностью и неровными (изрезанными) краями (форма «маргаритки»), диаметром 2-3,5 мм
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>mitis</i> и биовар <i>belfanti</i> , подвид <i>lausannense</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, блестящие, с ровным краем, диаметром не менее 0,5 мм	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, гладкие, блестящие, с ровным краем, диаметром 1,5-3 мм
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>intermedius</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, мелкие, плоские, диаметром 0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, мелкие, плоские, гладкие, с ровным краем, мягкой, маслянистой консистенции, диаметром 0,5-1,0 мм
<i>C. ulcerans</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, с ровным краем, с серебристым ободком по краю, блестящие, диаметром не менее 0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, выпуклые, блестящие, с ровным краем, диаметром 0,5-1,5 мм
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Колонии имеют серую окраску, округлые, непрозрачные, с ровным краем, диаметром не менее 0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, с ровным краем, шероховатые, диаметром 0,7-1,0 мм

Продолжение табл. 2 см. на стр. 434.

Микроорганизмы	Время инкубации посевов	
	24 часа	48 часов
КТА на основе Hoyle Medium agar (Oxoid)		
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>gravis</i>	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, слегка шероховатые, имеют легкую изрезанность края, маслянистой консистенции, могут крошиться при прикосновении, диаметром 0,8-1 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, приподнятые с выпуклым центром, шероховатые, диаметром 2-4 мм, имеют радиальную исчерченность (форма «маргаритки») или выраженную краевую изрезанность, часто крошатся при прикосновении
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>mitis</i> и биовар <i>belfanti</i> , подвид <i>lausannense</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, слегка выпуклые, слегка шероховатые, с ровным краем, маслянистой консистенции, диаметром 0,7-1 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, матовые, приподнятые с выпуклым центром, шероховатые, диаметром 2-3 мм, с ровными краями, часто крошатся при прикосновении
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>intermedius</i>	Колонии имеют серую окраску, мелкие, округлые, полупрозрачные, блестящие, диаметром 0,5-0,8 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, шероховатые, с ровным краем, маслянистой консистенции, диаметром 0,8-1,2 мм
<i>C. ulcerans</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, с ровным краем, блестящие, маслянистой консистенции, диаметром 0,3-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, слегка шероховатые, с неровной поверхностью, с ровным краем, диаметром 1,0-1,5 мм
<i>C.pseudotuberculosis</i>	Колонии имеют серую окраску, округлые, приподнятые, непрозрачные, с ровным краем, слегка шероховатые, диаметром 0,3-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, с ровным краем, шероховатые, могут крошиться при прикосновении, диаметром 0,8-1,2 мм
КТА на основе Columbia agar base (Conda)		
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>gravis</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, слегка шероховатые, имеют лёгкую изрезанность края, могут крошиться при прикосновении, диаметром 1-1,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, приподнятые с выпуклым центром, шероховатые, диаметром 2-2,5 мм, имеют радиальную исчерченность (форма «маргаритки»), часто крошатся при прикосновении
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>mitis</i> и биовар <i>belfanti</i> , подвид <i>lausannense</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, слегка шероховатые, с ровным краем, маслянистой консистенции, диаметром 0,7-1 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, приподнятые с выпуклым центром, шероховатые, с ровными краями, диаметром 1,5-2 мм, часто крошатся при прикосновении
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>intermedius</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, слегка приподнятые, блестящие, маслянистой консистенции, диаметром 0,3-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, шероховатые, с ровным краем, маслянистой консистенции, диаметром 0,8-1,0 мм
<i>C. ulcerans</i>	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, слегка выпуклые, с ровным краем, блестящие, маслянистой консистенции, диаметром 0,5-0,8 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, блестящие, но могут быть слегка шероховатыми, с неровной поверхностью, ровными краями, маслянистой консистенции, диаметром 1,0-1,5 мм
<i>C.pseudotuberculosis</i>	Колонии имеют серую окраску, округлые, слегка приподнятые, полупрозрачные, с ровным краем, блестящие, диаметром 0,5-0,7 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, с ровным краем, блестящие, но могут быть слегка шероховатыми, могут крошиться при прикосновении, диаметром 1,0-1,2 мм

Продолжение табл. 2 см. на стр. 435.

Микроорганизмы	Время инкубации посевов	
	24 часа	48 часов
КТА на основе Blood agar base (Conda)		
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>gravis</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, слегка шероховатые, имеют легкую изрезанность края, маслянистой консистенции, могут крошиться при прикосновении, диаметром 0,8-1,0 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, приподнятые с выпуклым центром, слегка шероховатые, с легкой изрезанностью края, могут иметь лёгкую радиальную исчерченность, диаметром 1,8-2 мм, часто крошатся при прикосновении
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>mitis</i> и биовар <i>belfanti</i> , подвид <i>lausannense</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, слегка шероховатые, с ровным краем, маслянистой консистенции, диаметром 0,7-0,8 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, приподнятые с выпуклым центром, шероховатые, с легкой изрезанностью края, диаметром 1,8-2,1 мм, часто крошатся при прикосновении
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>intermedius</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, слегка приподнятые, блестящие, маслянистой консистенции, диаметром 0,3-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, слегка шероховатые, с ровным краем, маслянистой консистенции, диаметром 0,8-1,0 мм
<i>C. ulcerans</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, слегка выпуклые, с ровным краем, блестящие, маслянистой консистенции, диаметром 0,5-0,8 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, слегка шероховатыми, с неровной поверхностью, маслянистой консистенции, диаметром 1,0-1,3 мм
<i>C.pseudotuberculosis</i>	Колонии имеют серую окраску, округлые, слегка приподнятые, непрозрачные, с ровным краем, блестящие, диаметром 0,3-0,5 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, с легкой краевой изрезанностью, слегка шероховатые, диаметром 1,2-1,7 мм
КТА на основе среды АГВ		
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>gravis</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, слегка шероховатые, имеют лёгкую изрезанность края, маслянистой консистенции, могут крошиться при прикосновении, диаметром 1,0-1,2 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, приподнятые, шероховатые, с изрезанным краем, могут иметь лёгкую радиальную исчерченность, диаметром 1,7-1,8 мм, часто крошатся при прикосновении
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>mitis</i> и биовар <i>belfanti</i> , подвид <i>lausannense</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, слегка шероховатые, с ровным краем, маслянистой консистенции, слегка крошится при прикосновении, диаметром 0,8-0,9 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), округлые, непрозрачные, приподнятые, шероховатые, с ровным краем, диаметром 1,7-1,8 мм, часто крошатся при прикосновении
<i>C. diphtheriae</i> биовар <i>intermedius</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, блестящие, маслянистой консистенции, диаметром 0,5-0,7 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, приподнятые, слегка шероховатые, с ровным краем, маслянистой консистенции, диаметром 0,8-1,0 мм
<i>C. ulcerans</i>	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, с ровным краем, блестящие, маслянистой консистенции, диаметром 0,5-0,8 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, слегка шероховатыми, с ровным краем, маслянистой консистенции, диаметром 1,1-1,2 мм
<i>C.pseudotuberculosis</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, выпуклые, непрозрачные, с ровным краем, блестящие, маслянистой консистенции, диаметром 0,5-0,7 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, с ровным краем, шероховатые, диаметром 0,8-1,0 мм
<i>C.pseudotuberculosis</i>	Колонии имеют тёмно-серую окраску, округлые, выпуклые, непрозрачные, с ровным краем, блестящие, маслянистой консистенции, диаметром 0,5-0,7 мм	Колонии имеют серо-чёрную окраску, округлые, непрозрачные, выпуклые, с ровным краем, шероховатые, диаметром 0,8-1,0 мм



Характер роста штаммов *C. diphtheriae* на питательных средах.

а – рост колоний *C. diphtheriae* биовар gravis № 665 на Коринебакагаре, б – рост колоний *C. diphtheriae* биовар mitis B-8628 на Коринебакагаре, в – рост колоний *C. diphtheriae* биовар gravis № 665 на КТА на основе Hoyle Medium agar, г – рост колоний *C. diphtheriae* биовар mitis B-8628 на основе Hoyle Medium agar, д – рост колоний *C. diphtheriae* биовар gravis № 665 на основе Columbia Agar Base, е – рост колоний *C. diphtheriae* биовар biовар mitis B-8628 на основе Columbia Agar Base.

Обсуждение. Цель культурального исследования на дифтерию – выделение и идентификация чистой культуры *C. diphtheriae* с применением минимального количества диагностических тестов, необходимых, достаточных и специфичных для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки: не менее 3 сут – отрицательный ответ, 3-4 сут – ответ о выделении токсигенных штаммов *C. diphtheriae*, 4-5 сут – ответ о выделении нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* или других представителей рода *Corynebacterium*. Несвоевременное выявление носителей токсигенных штаммов *C. diphtheriae* культуральным методом может привести к «скрытому» распространению *C. diphtheriae* и формированию новых очагов дифтерийной инфекции. Чтобы добиться максимальной высеваемости *C. diphtheriae* из исследуемого материала и роста колоний, видимых невооруженным глазом через 24 ч, необходимо создать оптимальные условия для роста, размножения этих бактерий, сохранения их биологических свойств, для ингибирования роста сопутствующей микрофлоры. Учитывая большое разнообразие питательных основ, представлена характеристика культурально-морфологических свойств штаммов *C. diphtheriae* разных биоваров и клинически значимых коринебактерий на средах первичного посева – Коринебакагаре и кровяных теллуритовых средах на разных питательных основах, которые используются на территории России. Анализ результатов по основным ростовым свойствам питательных сред, полученных при прове-

дении лабораторных исследований на тест-штаммах коринебактерий, свидетельствует о том, что все питательные среды обладают высокой чувствительностью – из разведения 10^{-7} (пробирка № 7) в отношении всех испытуемых штаммов. На питательных средах визуально обнаружен рост колоний коринебактерий уже через 19-20 часов культивирования. При культивировании взвеси бактерий из разведения 10^{-6} (пробирка № 6) на питательных средах количество колоний составило от 95 ± 5 до 120 ± 10 . Все питательные среды обладают дифференциально-диагностическими свойствами, обеспечивающими рост коринебактерий уже через сутки инкубации посевов, что сокращает сроки выдачи окончательного ответа.

На ряде питательных сред: Коринебакагаре (см. рисунок, а, б), кровяных теллуритовых средах на основе – СПА, Hoyle Medium agar (Oxoid) (см. рисунок в, г), Columbia Agar Base (Conda) (см. рисунок, д, е) – морфология колоний *C. diphtheriae* двух биоваров более выражена: колонии биовара gravis – шероховатые, со складчатой поверхностью и неровными (изрезанными) краями – тип «маргаритки» (рис. а, в, д), колонии штаммов биовара mitis – гладкие с ровными краями (рис. б, г, е).

Заключение. Все исследованные питательные среды – Коринебакагар и кровяные теллуритовые среды на различных питательных основах – обладают хорошими дифференциально-диагностическими свойствами, обеспечивающими рост *C. diphtheriae* и клинически значимых видов коринебактерий уже через сутки инкубации посевов, и могут быть использованы

в качестве сред для первичного посева патологического материала. При равном качестве характеристик исследованных питательных сред, Коринебакагар выгодно отличается простотой приготовления, исключающей необходимость внесения крови в питательную среду.

Финансирование. Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 10-15 см. REFERENCES)

1. О заболеваемости дифтерией, мониторинге за возбудителем и состоянием антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо № 01/13216-17-27 от 29.09.2017 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Available at: <https://www.rosпотребнадзор.ru/> (дата обращения: 18.03.2021).
2. О заболеваемости дифтерией, мониторинге за возбудителем и состоянием антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо № 01/16590-2018-27 от 19.12.2018 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Available at: <https://www.rosпотребнадзор.ru/> (дата обращения: 18.03.2021).
3. О заболеваемости дифтерией и состоянии антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо № 02/14390-2019-27 от 10.10.2019 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Available at: <https://www.rosпотребнадзор.ru/> (дата обращения: 18.03.2021).
4. О заболеваемости дифтерией и состоянии антитоксического противодифтерийного иммунитета населения России. Информационное письмо № 02/24680-2020-27 от 02.12.2020 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Available at: <https://www.rosпотребнадзор.ru/> (дата обращения: 18.03.2021).
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020. Available at: https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933 (дата обращения: 15.04.2021).
6. Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Чаплин А.В., Чагина И.А., Урбан Ю.Н. и др. Характеристика токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*, выделенных на территории России. *Инфекция и иммунитет*. 2020. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-0>.
7. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Борисова О.Ю., Пименова А.С., Гадуа Н.Т. Сравнительная характеристика питательных сред для выделения коринебактерий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;1: 59-64.
8. Шепелин А.П. Отечественная питательная среда – Коринебакагар для выделения возбудителя дифтерии. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2012; 4: 108-10.

REFERENCES

1. World Health Organization. Who vaccine-preventable diseases: Monitoring system 2020 global summary. Available at: https://apps.who.int/immunization_monitoring/globalsummary (accessed: 18.03.2021).
2. Centers for Disease Control and Prevention. Diphtheria [Электронный ресурс] // Manual for the surveillance of vaccine-preventable diseases. – Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. – Chap. 1. Available at: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt01-dip.pdf> (accessed: 18.03.2021).
3. Centers for Disease Control and Prevention. Diphtheria [Электронный ресурс] // Yellow Book 2020: health information

- for international travel. – New York: Oxford University Press, 2020. – Chap. 4. Available at: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/diphtheria> (accessed: 18.03.2021).
4. On the incidence of diphtheria, monitoring the causative agent and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter № 01/13216-17-27 from 29.09.2017 Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. Available at: <https://www.rosпотребнадзор.ru/> (accessed: 18.03.2021). (in Russian)
5. On the incidence of diphtheria, monitoring the causative agent and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter № 01/16590-2018-27 from 19.12.2018 Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. Available at: <https://www.rosпотребнадзор.ru/> (accessed: 18.03.2021). (in Russian)
6. On the incidence of diphtheria and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter № 02/14390-2019-27 from 10.10.2019 Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. Available at: <https://www.rosпотребнадзор.ru/> (accessed: 18.03.2021). (in Russian)
7. On the incidence of diphtheria and the state of antitoxic antidiphtheria immunity of the Russian population. Information letter № 02/24680-2020-27 from 02.12.2020 Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. Available at: <https://www.rosпотребнадзор.ru/> (accessed: 18.03.2021). (in Russian)
8. On the state of sanitary and epidemiological well-being in the Russian Federation in 2019: State Report. Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. 2020. Available at: https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933 (accessed: 15.04.2021). (in Russian)
9. Borisova O. Yu., Gadua N. T., Pimenova A. S., Shepelin A. P., Chaplin A. V., Chagina I. A., Urban Yu. N. Characterization of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in Russia. *Infektsiya i immunitet*. 2020. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-0>. (in Russian)
10. Zasada A. A., Rzeczkowska M. Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections, Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2019; 25(7): 1437-8.
11. Czajka U., Wiatrzyk A., Mosiej E., Forminska K., Zasada A.A. Changes in MLST profiles and biotypes of *Corynebacterium diphtheriae* isolates from the diphtheria outbreak period to the period of invasive infections caused by nontoxigenic strains in Poland (1950-2016). *BMC Infectious Diseases*. 2018; 18(1): 121.
12. Dangel A., Berger A., Konrad R., Bischoff H., Sing A. Geographically Diverse Clusters of Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* Infection, Germany, 2016-2017. *Emerging Infectious Diseases*. 2018; 24(7): 1239-45.
13. Hacker E., Antunes C.A., Mattos-Guaraldi A.L., Burkovski A., Tauch A. *Corynebacterium ulcerans*, an emerging human pathogen. *Future Microbiology*. 2016; 11: 1191-1208.
14. Moore L.S.P., Leslie A., Meltzer M., Sandison A., Efstratiou A., Sriskandan S. *Corynebacterium ulcerans* cutaneous diphtheria. *The Lancet Infectious Diseases*. 2015; 15(9): 1100-7.
15. De Oliveira Dias A.A.D.S., Santos L.S., Sabbadini P.S., Santos C.S., Silva Junior F.C., Napoleao F. et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Revista de Saude Publica*. 2011; 45(6): 1176-91.
16. Shepelin A.P., Polosenko O.V., Borisova O.Yu., Pimenova A.S., Gadua N.T. The comparative characteristic of growth mediums for separation of *Corynebacteria*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 1: 59-64. (in Russian)
17. Shepelin A.P. National nutrient environment – *Corynebacterium* to highlight the causative agent of diphtheria *Kurskiy nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'ye»*. 2012; 4:108-10. (in Russian)

Поступила 25.04.21
Принята к печати 10.05.21

Детушева Е. В.¹, Ершова О. Н.², Фурсова Н. К.¹

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ПЛАНКТОННЫХ КУЛЬТУР И БИОПЛЁНОК ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ К КОММЕРЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ И АНТИСЕПТИКОВ

¹ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Оболенск, Московская обл., Россия;

²ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ, 125047, Москва, Россия

Изучена антибактериальная активность *in vitro* 11 коммерческих препаратов дезинфектантов и 8 антисептиков против 10 штаммов бактерий *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Providencia stuartii*, полученных из международных коллекций и выделенных от пациентов нейрореанимации г. Москвы в 2018-2019 годах. Чувствительность планктонных культур к препаратам определяли методом серийных разведений в бульоне и спот-методом на плотных питательных средах, чувствительность биоплёнок – методом аппликаторов. Выявлена общая закономерность: уровень чувствительности к тестируемым дезсредствам у клинических штаммов ниже, чем у референс-штаммов. Дезинфектанты «Микробак-Форте», «SAT-22», «Необак-Окси» эффективны против бактерий всех тест-штаммов, как в планктонном состоянии, так и в виде биоплёнок. Препараты дезинфектантов «Биодез-Оптима», «Биодез-Экстра ДВУ», «Новодез-Актив», «Триосепт-Окси», «Тристал Фьюз для поверхностей», «Эффект-Форте плюс», «Лактик-Окси» не обладают достаточной эффективностью в концентрациях, используемых в отделении нейрореанимации, поэтому предлагается использовать эти препараты в более высоких концентрациях. Выявлено, что дезсредство «Биодез-Экстра ДВУ» способно подавлять рост биоплёнок *K. pneumoniae*. Для дезсредства «Тристал Фьюз для поверхностей» выявлена способность подавлять рост биоплёнок *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*. Бактерии всех использованных тест-штаммов в планктонном состоянии чувствительны ко всем тестируемым препаратам антисептиков. Биоплёнки клинических штаммов *P. aeruginosa* и *P. stuartii* обладают устойчивостью к антисептикам «Октенидол», «Октенисепт», «Мирамистин», «Гексорал». Проведённые исследования указывают на необходимость анализа чувствительности к антибактериальным препаратам у госпитальных патогенов, включая моделирование бактериальных биоплёнок, что является актуальным и важным научным направлением, необходимым для совершенствования контроля ИСМП в РФ.

Ключевые слова: дезинфектанты; антисептики; антибактериальная активность; резистентность; планктонные бактерии; биоплёнки.

Для цитирования: Детушева Е.В., Ершова О.Н., Фурсова Н.К. Исследование антибактериальной активности дезсредств и антисептиков различных классов против бактериальных возбудителей внутрибольничных инфекций. Клиническая лабораторная диагностика. 2021; 66 (7): 438-447. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-438-447>

Detusheva E.V.¹, Ershova O.N.², Fursova N.K.¹

THE SENSITIVITY OF PLANKTONIC CULTURES AND BIOFILMS OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA TO COMMERCIAL DISINFECTANT AND ANTISEPTIC PREPARATIONS

¹State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, Russia;

²Burdenko Neurosurgery Institute, Moscow, Russia

The *in vitro* antibacterial activity of 11 commercial disinfectant preparations and 8 antiseptics against 10 strains of the bacteria *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae* and *Providencia stuartii* obtained from international collections and isolated from neuroresuscitation patients in Moscow in 2018 was studied. The sensitivity of planktonic cultures to the preparations was determined by the method of serial dilutions in broth and the spot method on solid nutrient media, the sensitivity of biofilms by the applicator method. A general pattern was revealed: the level of sensitivity to tested disinfectants in clinical strains was lower than in reference strains. It was found that the disinfectants «Mikrobak-Forte», «SAT-22», «Neobak-Oksi» at the concentrations recommended by the manufacturers were effective against bacteria of all test strains, both in the plankton state and in the form of biofilms. On the contrary, the disinfectant preparations «Biodez-Optima», «Biodez-Extra DVU», «Novodez-Aktiv», «Triosept-Oksi», «Tristel Fusion for Surfaces», «Effect-Forte Plus», «Lactic-Oxy» did not have sufficient effectiveness in the concentrations recommended by the manufacturers, therefore it is proposed to use these drugs in higher concentrations. It was found that the disinfectant «Biodez-Extra DVU» is able to inhibit the growth of biofilms of bacteria of the species *K. pneumoniae*. The ability to suppress the growth of bacterial biofilms of *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* was revealed for the «Tristel Fusion for surfaces disinfectant».

The bacteria of all used test strains in the planktonic state were sensitive to all tested antiseptic preparations. However, the biofilms of the clinical strains of *P. aeruginosa* and *P. stuartii* possessed resistance to the antiseptics «Octenidol», «Octenisept», «Miramistin», «Hexoral». Our studies indicate the need for sensitivity analysis of antibacterial drugs in representatives of hospital pathogens, including the modeling of bacterial biofilms, which is a very relevant and important scientific direction, necessary to improve the control of nosocomial infections in the Russian Federation.

Key words: disinfectants; antiseptics; antibacterial activity; resistance; planktonic bacteria; biofilms.

For citation: Detusheva E.V., Ershova O.N., Fursova N.K. The study of the antibacterial activity of disinfectants and antiseptics of various classes against bacterial pathogens of nosocomial infections. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (7): 438-447 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-7-438-447>

For correspondence: Detusheva Elena Vladimirovna, Ph.D. biol. Sci., Researcher, Department of Molecular Microbiology, Laboratory of Antimicrobial Preparations; e-mail: detushevaev@obolensk.org

Information about authors:

Detusheva E.V., <http://orcid.org/0000-0003-3478-6534>;

Fursova N.K., <http://orcid.org/0000-0001-6053-2621>;

Ershova O.N., <http://orcid.org/0000-0003-3175-2910>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.07.2020

Accepted 01.09.2020

Введение. Согласно многочисленным исследованиям последних лет, одним из источников внутрибольничных инфекций и фактором персистенции их возбудителей в госпитальных экосистемах, от воздуха и воды до внутренней поверхности катетеров и систем организма, являются биоплёнки [1-3]. В составе биоплёнок бактерии проявляют специфические свойства, включая повышенную устойчивость к обработке дезсредствами и антисептиками, которые широко используются в медицинских организациях в качестве средств неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [4, 5]. Отмечен факт выживаемости микроорганизмов после длительного воздействия биоцидными препаратами на медицинских устройствах, в полостях организма человека, на пищевых продуктах, бытовых объектах [6-10].

Подразделение биоцидов на дезинфектанты (препараты для обработки абиотических поверхностей) и антисептики (средства для обработки биотических поверхностей) весьма условно, так как в некоторых случаях одно и то же средство, в зависимости от концентрации, может быть использовано и как дезинфектант, и как антисептик. Хлоргексидин используется в качестве дезинфектанта для общей дезинфекции помещений, санитарного оборудования в концентрациях 1-2%, в качестве антисептика – в концентрации 0,05-0,5% [11]. Антибактериальное действие дезинфектантов и антисептиков основано на изменении параметров окружающей среды (ионное равновесие, осмотическое давление). При биостатическом действии препарата нарушаются обменные процессы в клетке, что ведёт к замедлению размножения микроорганизмов. При удалении препарата из окружающей среды физиологическая активность микроорганизмов восстанавливается. Биоцидное действие дезсредств основано на необратимом нарушении структур и функций клеток микроорганизмов, зачастую связанному со свертыванием белков цитоплазмы, что ведёт их к гибели [12, 13].

При всем многообразии используемых на практике дезинфицирующих средств, спектр химических соединений, используемых для их получения, ограничен: галогены, спирты, перекиси, фенолы, четвертичные аммониевые соединения (ЧАС), альдегиды, третичные амины, кислоты [14].

Одним из факторов, приводящих к устойчивости бактерий к химическим дезинфицирующим средствам, является переоценка существующих методов лабораторного определения чувствительности бактерий к антимикробным препаратам (АМП). Исследования, выполненные на свободно планктонных культурах, дают результаты, которые не всегда обеспечивают надёжное использование биоцидных препаратов на практике. Важным моментом является необходимость мониторинга чувствительности бактериальных патогенов, циркулирующих в госпитальной среде, поскольку данная среда является резервуаром для образования резистентных форм бактерий не только к антибиотикам, но и к антисептикам и дезинфектантам [15].

Цель работы – оценка антибактериальной активности дезсредств и антисептиков различных классов против бактериальных возбудителей ИСМП.

Материал и методы. Препараты дезсредств и антисептиков. Использованы 11 препаратов дезсредств и 8 препаратов антисептиков, относящихся к различным функциональным классам (табл. 1, 2).

Штаммы бактерий. В работе использованы референс-штаммы *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 15308, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk», клинические штаммы *K. pneumoniae* B-2523/18, *K. pneumoniae* B-14/19, *K. pneumoniae* B-101/19, *A. baumannii* B-2996/18, *P. aeruginosa* B-2099/18, *Providencia stuartii* B-2426/18, выделенные от пациентов отделения нейрореанимации в 2018-2019 г., охарактеризованные по фенотипам антибиотикорезистентности и наличию генов β -лактамаз (bla_{SHV} , bla_{TEM} , bla_{CTX-M} , bla_{OXA-48} , bla_{VIM} и bla_{NDM}) и интегронов класса 1 ($int1$) [16, 17] (табл. 3).

Культивирование и видовая идентификация бактерий. Для культивирования бактерий использован агар и бульон ГРМ № 1 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия), агар Мюллера-Хинтона (Himedia, Mumbai, Индия), хранение – в 20%-ном глицерине при температуре минус 70 °C. Видовую идентификацию бактерий проводили на масс-спектрометре MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия).

Определение способности бактерий к образованию биоплёнок. Эффективность образования бактери-

Таблица 1

Препараты дезинфекционных средств, использованные в работе

Наименование препарата, производитель	Группа по ДВ	Состав и концентрации ДВ	Концентрации*, рекомендованные производителем, %	Концентрации*, используемые в исследовании, %
Биодез-Оптим (ООО Биодез, Россия)	ЧАС	Алкилдиметилбензиламмоний хлорид-25%	1,0 / 0,25	0,05 / 0,01
Дезин (ООО Дезиндустрия, Россия)	Неполимерный гуанидин	Хлоргексидина биглюконат-20%	2,0 / 0,5	2,0 / 0,4
Биодез-Экстра ДВУ (ООО Биодез, Россия)	ЧАС+альдегид	Смесь ЧАС-24 %, глутаровый альдегид-7%, глиоксаль-6%	2,0 / 1,0	0,05 / 0,03
Новодез-Актив (АО НПО Новодез, Россия)	Кислородсодержащие	Смесь ЧАС-33%, N,N-бис(3-аминопропил)додециламин-5%	0,5 / 0,2	0,5 / 0,2
Триосепт-Окси (ООО НПО СпецСинтез, Россия)	ЧАС+кислородо-содержащее	Перекись водорода-25%, дидецилдиметиламмоний хлорид-5%, вспомогательный компонент – фосфорная кислота	2,5 / 0,08	0,15 / 0,05
САТ-22 (ООО Сателлит, Россия)	ЧАС+амин+гуанидин	Смесь ЧАС-15%, N,N-бис(3-аминопропил)додециламин – 4%, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид -5%	0,7 / 0,17	1,5 / 0,36
Микробак Форте (BODE Chemie GmbH, Германия)	ЧАС+амин	Бензалконий хлорид – 20,0%, додецилбиспропилен триамин – 5,0%	2,5 / 0,63	2,5 / 0,63
Тристел-Фьюз (Tristel Solutions Limited, Великобритания)	Окислители	База: лимонная кислота – 5%, активатор: хлорит натрия – 0,5%. При смешении компонентов образуется диоксид хлора	2,0 / 2,0	2,0 / 2,0
Эффект-Форте плюс (ООО Биодез, Россия)	ЧАС+амин+гуанидин	Клатрат дидецилдиметиламмония бромид – 20% (соответствует содержанию ЧАС в концентрате 6%), алкилдиметилбензиламмоний хлорид – 5%, полигексаметиленбигуанидин – 3%, N,N-бис(3-аминопропил) додециламин – 6%	4,0 / 0,8	0,05 / 0,01
Лактик-Окси (АО НПО Новодез, Россия)	ЧАС+кислородо-содержащее	Комплекс ЧАС (алкилдиметилбензиламмоний хлорид и дидецилдиметиламмоний хлорид – 30,0 %), перекись водорода – 5,5%	8,0 / 2,8	3,0 / 1,05
Необак-Окси (АО НПО Новодез, Россия)	ЧАС+гуанидин	Комплекс ЧАС (алкилдиметилбензиламмоний хлорид и алкилдиметилэтилбензиламмоний хлорид 7,5%), полигексаметиленгуанидин гидрохлорид – 2%, перекись водорода – 12%	7,0 / 1,54	5,0 / 1,1

Примечание. ЧАС – четвертично-аммониевые соединения, ДВ – действующее вещество; * - концентрации, рекомендованные производителем для бактерий, микобактерий, грибов, спор по препарату / действующему веществу.

альных биоплёнок определяли при помощи метода, основанного на способности красителя кристаллического фиолетового связываться с клетками и матриксом биоплёнок [18]. Для получения биоплёнок использованы 96-луночные плоскодонные культуральные планшеты, в которые засевали по 200 мкл суточной бактериальной культуры в концентрации 10^6 КОЕ/мл, культивировали 24 ч при температуре 37° С. Из лунок планшета осторожно отбирали среду с планктонными клетками. Для удаления оставшихся планктонных

клеток лунки с биоплёнками промывали в течение 2-3 мин стерильным буфером PBS (NaCl – 8 г, KCl – 0,2 г, Na_2HPO_4 – 1,44 г, KH_2PO_4 – 0,24 г. на 1 л, pH=7.4) в том же объёме, после чего буфер полностью удаляли пипетированием. В каждую лунку вносили по 200 мкл отфильтрованного 0,1% раствора генциана фиолетового, инкубировали биоплёнки с красителем в течение 10-15 мин при комнатной температуре, после чего краситель пипетированием полностью удаляли из лунки. Не связавшийся краситель тщательно

Таблица 2

Препараты антисептиков, использованные в работе

Антисептики		
Бонадерм-АФ (АО НПО «Новодез», Россия)	ЧАС+производные фенола	2-феноксизтанол-2 %, алкилдиметилбензиламмоний хлорид-0,1%
Мелисептол-Рapid (Б. Браун Медикал АГ», Швейцария)	Пропиловый спирт+ЧАС	Пропиловый спирт-50 %, дидецилдиметиламмоний хлорид-0,075%
Октенидол (Шюльке и Майр ГмбХ, Германия)	КПАВ	Октенидина дигидрохлорид
Октенисепт (Шюльке и Майр ГмбХ, Германия)	КПАВ	Октенидина дигидрохлорид 0,1 г феноксиэтанол 2 г на 100 мл
Триосепт-Экспресс (ООО «НПО СпецСинтез», Россия)	Смесь пропиловых спиртов+хлоргексидин+ЧАС+амин	Изопропанол-30%, н-пропанол-31%, дидецилдиметиламмоний хлорид-0,1%, N,N-бис(3-аминопропил)додециламин-0,05 %, хлоргексидина биглюконат-0,1%
Бацилол-плюс («Бодэ Хеми ГмбХ и Ко», Германия)	Смесь пропиловых спиртов+альдегид	Пропанол-40,0 %, изопропанол-20,0 %, глutarовый альдегид-0,1%
Мирамистин (ООО «ИНФАМЕД К», Россия)	ЧАС	Бензилдиметил 3-(миристоиламино)пропиламмоний хлорид моногидрат 0,01%
Гексорал (Johnson&Johnson, Франция)	На основе гектетицина	Гексетидин 0,1% (1,3-бис(2-Этилгексил)гексагидро-5-метил-5-пиримидинамин)

Примечание. ЧАС – четвертично-аммониевые соединения, КПАВ – катионные поверхностно-активные вещества.

Таблица 3

Фенотипы и генотипы антибиотикорезистентности клинических штаммов бактерий

Штамм	Дата выделения	Источник выделения	Устойчивость к АМП	Гены антибиотико-резистентности
<i>K. pneumoniae</i> B-2523/18	30.08.2018	Кровь	AMP	<i>bla</i> _{SHV}
<i>K. pneumoniae</i> B-14/19	09.01.2019	Ликвор	AMP, AMS, CEF, CEX, CAZ, CPS, FEP, IMI, ERM, TET, TGC, CIP, CM, GEN, TOB, NIT	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA-48}
<i>K. pneumoniae</i> B-101/19	21.01.2019	Трахея	AMP, AMS, CEF, CEX, CPS, IMI, ERM, TET, TGC, CIP, CM, GEN, TOB, AMI, BIS, NIT	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>int1</i>
<i>A. baumannii</i> B-2996/18	01.10.2018	Ликвор	AMS, CEF, CEX, CPS, FEP, IMI, CIP, GEN, TOB, BIS	<i>int1</i>
<i>P. aeruginosa</i> B-2099/18	15.10.2018	Трахея	CEF, CTX, CTA, CAZ, CPS, FEP, MER, CIP, GEN, AMI, NIT	<i>bla</i> _{VIM} , <i>int1</i>
<i>P. stuartii</i> B-2426/18	B-2426/18	Центральный венозный катетер	CEF, CEX, CTA, CAZ, CPS, ERM, IMI, TET, TGC, CIP, CM, GEN, TOB, NIT	<i>bla</i> _{NDM} , <i>int1</i>

Примечание. AMP – ампициллин, AMS – ампициллин-сульбактам, CEF – цефоперазон, CEX – цефокситин, CTX – цефотаксим, CAZ – цефтазидим, CTA – цефтриаксон, CPS – цефоперазон-сульбактам, FEP – цефепим, IMI – имипенем, ERM – эртапенем, TET – тетрациклин, TGC – тигециклин, CIP – ципрофлоксацин, CM – хлорамфеникол, GEN – гентамицин, TOB – тобрамицин, AMI – амикацин, BIS – бисептол, NIT – нитрофурантоин.

смывали PBS буфером, планшеты переворачивали на фильтровальную бумагу и высушивали. После полного высыхания поверхности в лунки добавляли 200 мкл смеси этанола-изопропанола (1:1), смывали краситель с поверхности лунок, отбирали и помещали в чистые плоскодонные планшеты. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 590 нм на приборе xMark™ Microplate Absorbance Spectrophotometer (Bio-Rad, США). Результаты измерений интерпретировали, сравнивая показатели OD₅₉₀ образцов с таковым негативного контроля (чистого растворителя без добавления красителя).

Отсутствие биоплёнки фиксировали при значениях (OD₅₉₀ образца ≤ OD₅₉₀ контроля), слабую степень продукции биоплёнки – при (OD₅₉₀ контроля < OD₅₉₀ образца ≤ 2 OD₅₉₀ контроля), среднюю степень продукции биоплёнки – при (2 OD₅₉₀ контроля < OD₅₉₀ образца ≤ 4 OD₅₉₀ контроля), высокую степень продукции биоплёнки – при (4 OD₅₉₀ контроля < OD₅₉₀ образца), в соответствии с рекомендациями L.V. Rodrigues и соавт. [19]. Все эксперименты проводили в трёх повторностях.

Чувствительность к АМП. Минимальные подавляющие концентрации 26 АМП 8 функциональных

групп: пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов, аминогликозидов, фторхинолонов, сульфаниламидов, тетрациклинов, полимиксинов определяли на приборе Vitek 2 Compact с использованием карт AST N-101 и AST N-102 (BioMérieux, Франция). Интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с рекомендациями EUCAST Version 9.0 (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables). В качестве контрольных использовали штаммы *E. coli* ATCC 25922 и ATCC 35218.

Определение чувствительности планктонных клеток бактерий к препаратам дезсредств. Минимальные бактерицидные концентрации (МБК) дезсредств определяли методом серийных разведений в бульоне (МУК 4.2.1890-04), методом микрокапель, нанося 10 мкл бактериальной суспензии исследуемой культуры в концентрации 10^7 - 10^8 КОЕ/мл на поверхность питательного агара, содержащего серийные разведения дезсредства. За МБК препарата принимали его минимальную концентрацию, при которой отсутствовал рост тест-культуры [20]. В исследовании не оценивали вклад отдельных компонентов и их возможное синергидное действие.

Определение чувствительности бактериальных биоплёнок к препаратам дезсредств. Чувствительности бактериальных биоплёнок к тестируемым препаратам определяли методом аппликаторов [20]: поверхность питательного агара, не содержащего АМП, засеивали 0,1 мл суспензии тест-культуры в концентрации 10^9 КОЕ/мл. Посевы инкубировали при температуре 37 °C в течение 24 ч, после чего на поверхность бактериального газона накладывали при помощи стерильного пинцета стерильные целлюлозные аппликаторы (7×7 мм) на 2-3 мин. Аппликаторы с отпечатками культуры переносили стерильным пинцетом на поверхность агара в чашки Петри с питательной средой, содержащей серийные разведения препарата. Чашки инкубировали при температуре 37 °C в течение 48 ч, учитывали результаты. За МБК принимали

минимальную концентрацию препарата, при которой отсутствовал рост культуры на аппликаторе и вокруг него.

Результаты. Оценка интенсивности биоплёнкообразования тест-штаммами микроорганизмов. Анализ величин относительных показателей плотности биоплёнок, сформированных бактериями использованных штаммов в лунках культуральных планшетов, позволил подразделить штаммы на две категории: штаммы с высокой степенью образования биоплёнок ($n=7$) и штаммы со средней степенью образования биоплёнок ($n=3$). Доля штаммов с высокой степенью образования биоплёнок выше среди референс-штаммов (4 из 5 штаммов), чем среди коллекционных штаммов (2 из 4 штаммов) (табл. 4).

Антибактериальная активность биоцидов против штаммов бактерий возбудителей внутрибольничных инфекций. Использован разработанный нами ранее методический подход, позволяющий проводить сравнительный анализ чувствительности микроорганизмов к АМП, в том числе к антисептикам и дезинфектантам, в планктонном состоянии и для биоплёнок. Чувствительность бактерий к биоцидам изучена на препаратах, относящихся к разным функциональным классам (см. табл. 1, 2).

Показано, что планктонные клетки исследуемых штаммов бактерий более чувствительны к исследуемым дезсредствам, чем бактериальные клетки тех же штаммов в составе биоплёнки, что, по-видимому, связано с влиянием факторов, характерных для бактериальных биоплёнок – наличием внеклеточного матрикса [21], особенностями субстрата на котором формируется биоплёнка [22] продукции генов резистентности, характерных для биоплёнок [23,24]. Исключение составил препарат «Тристел-Фьюз» с действующим веществом (ДВ) – диоксид хлора, образующимся при смешивании компонентов перед использованием, для которого значения МБК для планктонных клеток совпали с МБК для биоплёнок штаммов *K. pneumoniae*

Таблица 4

Степень биоплёнкообразования бактериями тест-штаммов

Штаммы	OD ₅₉₀	Степень образования биоплёнки
Референс-штаммы		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	0,255±0,008	Средняя
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	0,383±0,013	Высокая
<i>A. baumannii</i> ATCC 15308	0,391±0,005	Высокая
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	0,301±0,008	Средняя
Клинические штаммы		
<i>K. pneumoniae</i> B-2523/18	0,399±0,011	Высокая
<i>K. pneumoniae</i> B-101/19	0,303±0,022	Высокая
<i>K. pneumoniae</i> B-14/19	0,255±0,009	Средняя
<i>A. baumannii</i> B-2996/18	0,415±0,012	Высокая
<i>P. aeruginosa</i> B-2099/18	0,452±0,018	Высокая
<i>P. stuartii</i> B-2426/18	0,368±0,012	Высокая

Таблица 5

Чувствительность к дезинфектантам планктонных клеток и биоплёнок тест-штаммов бактерий

Штамм		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Референс-штаммы												
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	П	0,02	0,03	0,03	0,06	0,02	0,006	0,02	2	0,02	0,01	0,08
	Б	0,1	0,13	0,06	0,25	1	0,1	0,1	2	0,1	0,05	0,6
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	П	0,06	0,005	0,03	0,13	0,02	0,02	0,04	2	0,06	0,02	0,08
	Б	0,5	0,06	0,13	1	1	0,2	0,2	2	0,25	0,4	0,6
<i>A. baumannii</i> ATCC 15308	П	0,01	0,004	0,004	0,06	0,004	0,02	0,02	1	0,06	0,006	0,04
	Б	0,1	0,06	0,06	0,5	0,2	0,1	0,1	1	0,1	0,02	0,3
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	П	0,01	0,005	0,004	0,06	0,001	0,02	0,02	1	0,03	0,006	0,02
	Б	0,1	0,13	0,25	1	1	0,2	0,1	1	0,1	0,02	0,6
Клинические штаммы												
<i>K. pneumoniae</i> B-2523/18	П	0,02	0,02	0,06	0,06	0,004	0,05	0,01	0,5	0,06	0,02	0,04
	Б	0,1	0,25	0,06	2	1	0,38	0,08	2	2	0,4	2,5
<i>K. pneumoniae</i> B-14/19	П	0,02	0,03	0,06	0,06	0,004	0,006	0,02	1	0,1	0,02	0,01
	Б	0,1	0,5	0,06	0,5	0,5	0,38	0,3	2	0,5	0,1	1,3
<i>K. pneumoniae</i> B-101/19	П	0,02	0,03	0,02	0,06	0,01	0,012	0,04	2	0,02	0,02	0,02
	Б	0,1	0,25	0,04	1	0,5	0,38	0,08	2	0,25	0,05	1,3
<i>A. baumannii</i> B-2996/18	П	0,02	0,03	0,02	0,06	0,01	0,006	0,02	2	0,02	0,02	0,01
	Б	0,5	0,13	0,06	1	0,25	0,38	0,1	2	0,1	0,05	1,3
<i>P. aeruginosa</i> B-2099/18	П	0,13	0,13	0,008	0,031	0,01	0,012	0,16	2	0,03	0,02	0,02
	Б	2	0,25	1	2	1	0,38	0,3	2	0,5	3	2,5
<i>P. stuartii</i> B-2426/18	П	0,06	0,06	0,008	0,031	0,004	0,023	0,08	0,5	0,03	0,02	0,02
	Б	1	2	1	1	1	0,72	1,2	4	2	1,5	2,5

Примечание. П – планктонные клетки, Б – биоплёнки. I – «Биодез-Оптим», II – «Дезин», III – «Биодез-Экстра ДВУ», IV – «Новодез-Актив», V – «Триосепт-Окси», VI – «САТ-22», VII – «Микробак Форте», VIII – «Тристел Фьюз», IX – «Эффект-Форте плюс», X – «Лактик-Окси» XI – «Необак-Окси». Жирным шрифтом отмечены значения МБК, превышающие рекомендованную к использованию концентрацию.

В-2523/18 и *P. stuartii* B-2426/18, что, вероятно, связано с тем, что данный препарат разрушал биоплёнку. Все исследуемые штаммы бактерий в планктонном состоянии и в виде биоплёнок, за исключением биоплёнки штамма *P. stuartii* B-2426/18, проявляли чувствительность к средству «Тристел-Фьюз» (табл. 5).

Большинство использованных в работе штаммов в планктонном состоянии и в виде биоплёнок, за исключением штаммов *A. baumannii* ATCC 15308 и *E. cloacae* ATCC 1304, устойчивы к дезсредству «Биодез-Оптим» в концентрации 0,05%, (что соответствует концентрации алкилдиметилбензиламмоний хлорида 1,25%), рекомендованной производителем как губительная для бактерий, вирусов, микобактерий, грибов.

Штаммы *K. pneumoniae* B-2523/18 и *K. pneumoniae* B-14/19 в планктонном состоянии и в виде биоплёнок чувствительны к дезсредству «Биодез-Экстра ДВУ» в применяемой в отделении нейрореанимации концентрации 0,05%, что соответствует концентрациям ДВ: 1,2% смеси ЧАС, 0,35% глутарового альдегида и 0,3% глиокала. В состоянии биоплёнки все исследуемые штаммы кроме *K. pneumoniae* B-101/19 проявляли устойчивость к данному препарату в этой концентрации.

Средство «Новодез-Актив» (смесь ЧАС, N,N-бис(3-аминопропил)додециламин) в используемой в отделении нейрореанимации концентрации 0,5% эффективно против всех исследуемых штаммов бактерий в планктонном состоянии, все клинические штаммы, кроме *K. pneumoniae* B-14/19, типовые штаммы *P. aeruginosa* ATCC 2785 и *E. cloacae* ATCC 13047 проявляли устойчивость в состоянии биоплёнки.

Препарат «Триосепт-Окси» в применяемой в отделении нейрореанимации концентрации 0,15% (перекись водорода 3,75%, дидецилдиметиламмоний хлорид 0,75%) эффективен против всех исследуемых штаммов бактерий в планктонном состоянии, в состоянии биоплёнки все исследуемые штаммы устойчивы к данному препарату.

Дезсредства «Микробак-Форте» (бензалконий хлорид, додецилбиспропилен триамин) и «САТ-22» (смесь ЧАС, N,N-бис(3-аминопропил)додециламин, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид) в применяемых концентрациях 2,5 и 1,5%, соответственно, эффективны против всех исследуемых штаммов бактерий как в планктонном состоянии, так и в виде биоплёнок (табл. 5). Данные показатели чувствительности укладываются в диапазон концентраций, рекомендованных производителями (0,5-1% и 0,01-

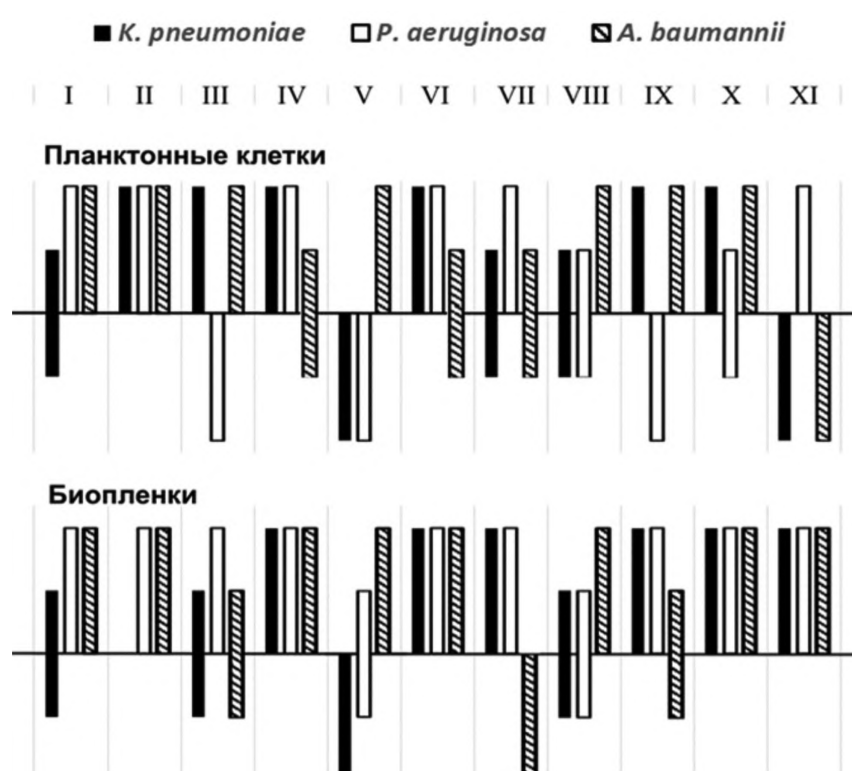


Рис. 1. Сравнение устойчивости к тестируемым дезинфектантам у клинических и типовых штаммов бактерий *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*: I – «Биодез-Оптима», II – «Дезин», III – «Биодез-Экстра ДВУ», IV – «Новодез-Актив», V – «Триосепт-Окси», VI – «САТ-22», VII – «Микробак Форте», VIII – «Тристел Фьюз», IX – «Эффект-Форте плюс», X – «Лактик-Окси» XI – «Необак-Окси».

1%, соответственно) против бактерий, микобактерий, вирусов.

Дезинфектант «Необак-Окси» (комплекс ЧАС, полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, перекись водорода) в применяемой в отделении концентрации 5% эффективно против всех исследуемых штаммов бактерий, как в планктонном состоянии, так и в виде биопленок, в концентрации 0,5% все исследованные штаммы кроме *A. baumannii* ATCC 15308, в состоянии биопленки проявили устойчивость к данному препарату.

Клинический штамм *K. pneumoniae* B-14/19, типовые штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *A. baumannii* ATCC 15308 проявляли чувствительность к средству «Эффект-форте плюс» в планктонном состоянии, в состоянии биопленки все исследуемые штаммы кроме *K. pneumoniae* B-2523/18 устойчивы к применяемой в отделении нейрореанимации концентрации 0,05% соответствующей 1% клатрата дидецилдиметиламмония бромида, 0,25% алкилдиметилбензиламмоний хлорида, 0,15% полигексаметиленбигуанидина.

Дезинфектант «Лактик-окси» эффективно против всех исследуемых штаммов бактерий в планктонном состоянии, в виде биопленки типовой штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, клинические *K. pneumoniae* B-2523/18, *P. aeruginosa* B-2099/18, *P. stuartii* B-2426/18 проявили устойчивость к данному средству в используемой в отделении концентрации 0,2%, что соответствует 12% ДВ перексомоносульфата калия (см. табл. 5).

Основываясь на показателях МБК тестируемых дезинфектантов полученных для референс- и клинических штаммов планктонном состоянии, а также в виде биопленки выявлено, что клинические штаммы в подавляющем большинстве более устойчивы к тестируемым дезинфектантам, по сравнению с референс-штаммами (рис. 1).

При определении чувствительности типовых штаммов *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 15308, *E. cloacae* ATCC 13047 и клинических штаммов *K. pneumoniae* B-2523/18, *K. pneumoniae* B-14/19, *K. pneumoniae* B-101/19, *A. baumannii* B-2996/18, *P. aeruginosa* B-2099/18, *P. stuartii* B-2426/18 к антисептикам показано, что все штаммы в планктонном состоянии чувствительны к тестируемым антисептикам. Антисептики – готовые к применению препараты, которые используются без разведения.

Штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* B-2099/18 в состоянии биопленки обладают устойчивостью к антисептикам «Октенисепт» и «Мирамистин», штамм *P. stuartii* B-2426/18 в состоянии биопленки обладает устойчивостью к антисептикам «Октенидол», «Октенисепт», «Мирамистин», «Гексорал». Штамм *E. cloacae* ATCC 13047 в состоянии биопленки обладает устойчивостью к антисептику «Октенисепт», в планктонном виде и в состоянии биопленки обладает устойчивостью к антисептику «Мирамистин» (табл. 6).

Обсуждение. В ходе исследования использован методический подход, позволяющий проводить срав-

Таблица 6

Чувствительность к антисептикам бактерий, в планктонном состоянии и в виде биоплёнок

Штамм		XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX
Референс-штаммы									
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	П	+	+	+	+	+	+	+	+
	Б	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	П	+	+	+	+	+	+	+	+
	Б	+	+	+	–	+	+	–	+
<i>A. baumannii</i> ATCC 15308	П	+	+	+	+	+	+	+	+
	Б	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	П	+	+	+	+	+	+	–	+
	Б	+	+	+	–	+	+	–	+
Клинические штаммы									
<i>K. pneumoniae</i> B-2523/18	П	+	+	+	+	+	+	+	+
	Б	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> B-14/19	П	+	+	+	+	+	+	+	+
	Б	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> B-101/20	П	+	+	+	+	+	+	+	+
	Б	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. baumannii</i> B-2926/18	П	+	+	+	+	+	+	+	+
	Б	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i> B-2099/18	П	+	+	+	+	+	+	+	+
	Б	+	+	+	–	+	+	–	+
<i>P. stuartii</i> B-2426/18	П	+	+	+	+	+	+	+	+
	Б	+	+	–	–	+	+	–	–

Примечание. П – планктонные клетки, Б – биоплёнки; «+» – антисептики, эффективные против тестируемых штаммов бактерий; «–» – антисептики, не эффективные против тестируемых штаммов бактерий; XII – «Бонадерм-АФ», XIII – «Мелисептол Репид», XIV – «Октенидол», XV – «Октенисепт», XVI – «Триосепт-Экспресс», XVII – «Бацилол-Плюс», XVIII – «Мирамистин», XIX – «Гексорал».

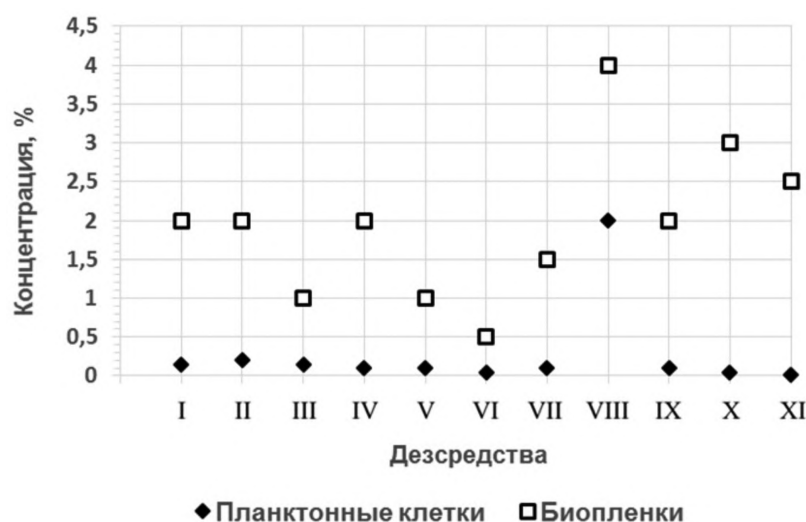


Рис. 2. Рекомендуемые концентрации дезинфектантов (по препарату), эффективные против планктонных культур и биопленок *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *P. stuartii* и *E. cloacae*.

нительный анализ чувствительности микроорганизмов к АМП, в том числе к антисептикам и дезинфектантам, в планктонном состоянии и для биоплёнок. Показано, что в подавляющем большинстве случаев

биоплёнки типовых штаммов *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 15308, *E. cloacae* ATCC 13047 и клинических штаммов *K. pneumoniae* B-2523/18, *K. pneumoniae* B-14/19,

K. pneumoniae B-101/19, *A. baumannii* B-2996/18, *P. aeruginosa* B-2099/18, *P. stuartii* B-2426/18 проявляли значительно большую устойчивость к дезсредствам, по сравнению с планктонными клетками.

Установлено, что дезсредства «Микробак-Форте», «САТ-22», «Необак-Окси» в концентрациях по ДВ, применяемых для обработки абиотических поверхностей (0,63, 0,17, 1,54% соответственно), эффективны против всех исследуемых штаммов бактерий как в планктонном состоянии, так и в виде биоплёнок.

Дезсредство «Биодез-Оптим» оказалось неэффективно против всех исследуемых штаммов бактерий в использованной в исследовании максимальной концентрации по ДВ (0,01%), поэтому для эффективного применения следует использовать более высокие концентрации данного дезсредства по ДВ 0,38-0,15% для планктонных клеток бактерий и 2% для биоплёнок.

Для дезсредств «Биодез-Экстра ДВУ», «Ново-дез-Актив», «Триосепт-Окси», «Тристел Фьюз для поверхностей», «Эффект-Форте плюс», «Лактик-Окси» показано отсутствие действия на биоплёнку исследуемых штаммов бактерий, поэтому предложено использование более высоких концентраций по ДВ: 0,12% – «САТ-22»; 0,5% – «Биодез-Экстра ДВУ», 0,3% – «Триосепт-Окси»; 0,38% – «Микробак-Форте»; 0,5% – для дезсредств «Биодез-Оптим», 0,4% – «Дезин», 1% – «Новодез-Актив», 0,4% – «Эффект-Форте плюс»; 2,5% – «Необак-Окси»; 3% – «Лактик-Окси», 4% – для «Тристел Фьюз для поверхностей».

Представляется необходимым скорректировать концентрации дезсредств применяемых против планктонных клеток: 0,1% для «Необак-Окси»; 0,5% – для дезсредств «Лактик-Окси», 0,012% «САТ-22»; 0,4% – для «Новодез-Актив», 0,05% «Триосепт-Окси», 0,03% «Микробак-Форте», 0,02% «Эффект-Форте плюс»; 0,03% для «Биодез-Оптим», 0,1% «Биодез-Экстра ДВУ», 2% для «Тристел Фьюз для поверхностей».

На основании проведённого анализа чувствительности исследуемых штаммов бактерий к дезсредствам, можно обозначить концентрации дезсредств, которые могут быть эффективны против планктонных клеток и биоплёнок этих штаммов бактерий (рис. 2).

Выявлено, что дезсредство «Биодез-Экстра ДВУ» (смесь ЧАС, глутаровый альдегид, глюксаль) способно подавлять рост биоплёнок *K. pneumoniae*, снижая МБК данного штамма до уровня планктонных клеток. Для дезсредства «Тристел Фьюз» (диоксид хлора, образующийся при смешении лимонной кислоты и хлорита натрия) для поверхностей выявлена способность подавлять рост биоплёнок *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*. Диоксид хлора обладает высоким окислительным потенциалом и способностью проникать сквозь защитные барьеры биоплёнки, реагирует с органическими веществами на поверхности клеточной мембраны, нарушая обменные процессы внутри биоплёнки [25 – 27]. Эти данные согласуются с результатами исследования М. Ехнер и соавт. [28] по предотвращению и контролю инфекций в учреждениях здравоохранения, в котором сообщалось, что диоксид хлора является эффективным методом удаления и предотвращения биоплёнок.

При определении чувствительности типовых штаммов *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. baumannii* ATCC 15308, *E. cloacae* ATCC 13047 и клинических штаммов *K. pneumoniae* B-2523/18, *K. pneumoniae* B-14/19, *K. pneumoniae* B-101/19, *A. baumannii* B-2996/18, *P. aeruginosa* B-2099/18, *P. stuartii* B-2426/18 к антисептикам показано, что все штаммы в планктонном состоянии, кроме *E. cloacae* ATCC 13047 чувствительны к тестируемому антисептику. Штаммы *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* B-2099/18, *E. cloacae* ATCC 13047 в состоянии биоплёнки обладают устойчивостью к антисептикам «Октенисепт» и «Мирамистин», штамм *P. stuartii* B-2426/18 в состоянии биоплёнки обладает устойчивостью к антисептикам «Октенидол», «Октенисепт», «Мирамистин», «Гексорал».

Проведено сравнение устойчивости типовых и клинических штаммов исследуемых бактерий, на основании которого выявлено, что клинические штаммы в подавляющем большинстве более устойчивы к тестируемому дезсредству по сравнению с типовыми.

Проведённые исследования указывают на необходимость углублённого анализа чувствительности к АМП госпитальных патогенов, включая моделирование биоплёнок для оценки реальной чувствительности к антисептикам и дезинфектантам, что является актуальным и важным научным направлением, необходимым для совершенствования контроля ИСМП в Российской Федерации.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Отраслевой программы Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (pp 1-10, 13, 15-19, 21-25, 28 см. REFERENCES)

11. Зверьков А. В., Зузова А. П. Хлоргексидин: прошлое, настоящее и будущее одного из основных антисептиков. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2013; 15(4): 279-85.
12. Шкарин В. В. Благодарова А. С., Ковалишена О. В. Современные представления о механизмах устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2011; 3: 48-53.
14. Осипова В. Л. *Дезинфекция: Учебное пособие*. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
20. Дегушева Е. В., Родин В. Б., Слукин П. В., Чугунов В. А., Ершова О. Н., Александрова И. А. и др. Чувствительность нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Proteus mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(1): 57-66.
26. Петренко Н. Ф., Мокиенко А. В. Диоксид хлора как средство устранения биоплёнок. *Вісник Одеської державної академії будівництва та архітектури*. 2005; 19: 58-63.
27. Мокиенко А. В., Петренко Н. Ф., Гоженко А. И. Обеззараживание воды. Гигиенические и медико-экологические аспекты. Т. 2. Диоксид хлора. Одесса: ТЭС; 2012.

REFERENCES

1. Donlan R. M. Costerton W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. 15(2): 167-93.
2. Kadam S., Shai S., Shahane A., Kaushik K. S. Recent advances in non-conventional antimicrobial approaches for chronic wound

- biofilms: Have we found the ‘chink in the armor’? *Biomedicines*. 2019; 7(2): 35.
3. Malone M., Goeres D.M., Gosbell I., Vickery K., Jensen S., Stoodley P. Approaches to biofilm-associated infections: the need for standardized and relevant biofilm methods for clinical applications. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2017; 15(2):147-56.
 4. Percival S. L., Vuotto C., Donelli G., Lipsky B. A. Biofilms and wounds: an identification algorithm and potential treatment options. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015; 4(7): 389-97.
 5. Sanchez-Vizuet P., Orgaz B., Aymerich S., Coq D. Le, Briand R. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front Microbiol.* 2015; 6: 705.
 6. Di Lodovico S., Cataldi V., Di Campli E., Ancarani E., Cellini L., Di Giulio M. *Enterococcus hirae* biofilm formation on hospital material surfaces and effect of new biocides. *Environ Health Prev Med.* 2017; 22: 63.
 7. Shen Y., Huang C., Monroy G. L., Janjaroen D., Derlon N., Lin J. et al. Response of simulated drinking water biofilm mechanical and structural properties to long-term disinfectant exposure. *Environ Sci Technol.* 2016; 50(4): 1779-87.
 8. Oxaran V., Dittmann K. K., Lee S. H. I., Chaul L. T., Oliveira C. A. F. Corassin C.H., Alves V. F., Pereira De Martinis E. C., Gram L. Behavior of foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in mixed-species biofilms exposed to biocides. *Appl. Environ Microbiol.* 2018; 84(24): e02038-18.
 9. Davis S. C., Ricotti C., Cazzaniga A., Welsh E., Eaglstein W. H., Mertz P. M. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization *in vivo*. *Wound Repair Regen.* 2008;16(1): 23-9.
 10. Cooper I. R., Mahenthalingam J., Hanlon G. W. Long-term persistence of a single *Legionella pneumophila* strain possessing the mip gene in a municipal shower despite repeated cycles of chlorination. *J. Hosp. Infect.* 70: 154-9.
 11. Zver'kov A. V., Zuzova A. P. Chlorhexidine: past, present and future of one of the main antiseptics. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya*. 2013; 15(4): 279-85. (in Russian)
 12. Shkarin V. V. Blagonravova A. S., Kovalishena O. V. Modern views on the mechanisms of resistance of microorganisms to disinfectants. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2011; 3: 48-53. (in Russian)
 13. Denyer S.P., Stewart GSAB. Mechanisms of action of disinfectants. *Int. Biodeter Biodegrad.* 1998;41:261-8.
 14. Osipova V. L. Desinfection: study guide. Moscow: GEOTAR-Media; 2009. (in Russian)
 15. Bardossy A. C., Zervos J., Zervos M. Preventing hospital-acquired infections in low-income and middle-income countries: impact, gaps, and opportunities. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2016; 30(3):805-18.
 16. Lev A. I., Astashkin E. I., Kislichkina A. A., Solovieva E. V., Kombarova T. I., Korobova O. V. et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012-2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog. Glob. Health.* 2018; 112 (3):142-51.
 17. Dyatlov I., Astashkin E., Kartsev N., Ershova O., Svetoch E., Firstova V., Fursova N. Novel blaCTX-M-2-type gene coding extended spectrum beta-lactamase CTX-M-115 discovered in nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates in Russia. In: Multidisciplinary Approaches for Studying and Combating Microbial Pathogens Formatex Research Center. Boca Raton, Florida, USA: Brown Walker Press; 2015.
 18. O'Toole G.A. Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 1998; 28(3): 449-61.
 19. Rodrigues L.B., Dos Santos L.R., Tagliari V.Z., Rizzo N.N., Trenhago G., de Oliveira A.P., Goetz F., do Nascimento V.P. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz. J. Microbiol.* 2010; 41(4): 1082-5.
 20. Detusheva E.V., Rodin V.B., Slukin P.V., Chugunov V.A., Ershova O.N., Aleksandrova I.A. et al. Sensitivity of nosocomial strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Proteus mirabilis* to a chlorhexidine-based antiseptic. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2015; 17 (1): 57-66. (in Russian)
 21. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8:632-3.
 22. Flemming H. C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S. A., Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14: 563-75.
 23. Król J. E., Hall D. C., Balashov S., Pastor S., Sibert J., McCaffrey J., Lang S., Ehrlich R. L., Earl J, Mell J. C., Xiao M., Ehrlich G. D. Genome rearrangements induce biofilm formation in *Escherichia coli* C – an old model organism with a new application in biofilm research. *BMC Genomics*. 2019; 20(1): 767.
 24. Ghigo J.M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*. 2001; 412(6845): 442-5.
 25. Mayack L. A., Soracco R. J., Wilde E. W. Comparative effectiveness of chlorine and chlorine dioxide biocide régimes for biofouling control. *Water Research*. 1984; 18(5): 593-9.
 26. Petrenko N.F., Mokienko A. V. Chlorine dioxide as a means of eliminating biofilms. *Visnik Odes'koï derzhavnoi akademii budivnictva ta arhitekturi*. 2005; 19: 58-63. (in Russian)
 27. Mokienko A. V., Petrenko N. F., Gozhenko A. I. Water disinfection. Hygienic and medical-ecological aspects. V. 2. Chlorine dioxide [Obezrazhivanie vody. Tom 2. Dioksid khloru]. Odessa: TES; 2012. (in Russian)
 28. Exner M., Kramer A., Lajoie L. Prevention and control of health care – associated waterborne infections in health care facilities. *Am. J. Infect. Control*. 2005; 33: 26-40.

Поступила 15.07.20
Принята к печати 01.09.20