

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.

Δ КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 66
10 • 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

ОКТАБРЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор
Е.М. Архилова

Сдано в набор 30.08.2021.
Подписано в печать 1.10.2021.
Формат 60 × 88%.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,67.

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

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

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

Индекс 71442 — для подписчиков

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

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2021. № 10. 577–640.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 66

10 • 2021

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

OCTOBER

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

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

Managing editor L.A. Shankina

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief A.Yu. MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRIKHINA,
A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, S.G. MARDANLY,
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*), A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*),
A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN
(*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), G.V. KOR-
SHUNOV (*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*),
E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*),
I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOVA (*Moscow*),
S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*),
I.S. TARTAKOVSKIY (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*),
L.A. KHOROVSKAYA (*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO
(*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL'
(*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Семёнова Н.В., Мадаева И.М., Колесникова Л.И.

Активность системы глутатиона в крови женщин с избыточной массой тела в постменопаузе 581

Мальцева Л.Д., Лакомова Д.Ю., Захарова Н.Б., Гурова Т.С., Морозова О.Л.

Потенциальные мишени для ранней диагностики острого повреждения почек у пациентов с COVID-19 (обзор литературы) 586

Попыхова Э.Б., Иванов А.Н., Степанова Т.В., Лагутина Д.Д., Савкина А.А.

Диабетическая нефропатия — возможности ранней лабораторной диагностики и прогнозирование течения (обзор литературы) 593

ЦИТОЛОГИЯ

Тарлычева А.А., Маркова Ж.Г., Юрченко Д.А., Шилова Н.В.

Оптимизация протокола обработки препаратов эякулята для последующего молекулярно-цитогенетического исследования 603

ИММУНОЛОГИЯ

Карзакова Л.М., Кудряшов С.И., Борисова Л.В., Журавлева Н.В., Комелягина Н.А., Одинцова А.В., Сидоров И.А.

Особенности иммунологического профиля крови и мочи у больных постинфекционным гломерулонефритом 610

Мальшикина А.И., Сотникова Н.Ю., Григушкина Е.В., Крошкина Н.В., Таланова И.Е.

Прогнозирование исхода беременности у женщин с привычным невынашиванием 618

МИКРОБИОЛОГИЯ

Герасимов В.Н., Харсеева Г.Г., Щербатая О.С., Котов С.А., Чепусова А.В.

Особенности ультраструктуры смешанных биопленок возбудителя дифтерии и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из респираторного тракта человека 623

Бочарова Ю. А., Савинова Т. А., Лямин А. В., Кондратенко О. В., Поликарпова С. В., Жилина С. В., Федорова Н. И., Семькин С. Ю., Чаплин А. В., Коростин Д. О., Маянский Н. А., Чеботарь И. В.

Особенности геномов и антибиотикорезистентные свойства штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации 629

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Петрашова Д.А., Коломейчук С.Н.

Полиморфный вариант *in/del* гена ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) и дестабилизация генома у детей, проживающих на Крайнем Севере 635

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Semenova N.V., Madaeva I.M., Kolesnikova L.I.*
Glutathione system activity in the blood of overweight postmenopausal women581
- Maltseva L.D., Lakomova D.Y., Zakharova N.B., Gurova T.S., Morozova O.L.*
Potential targets for preclinical diagnostics of acute kidney injury in covid-19 patients (review of literature) . .586
- Popykhova E.B., Ivanov A.N., Stepanova T.V., Lagutina D.D., Savkina A.A.*
Diabetic nephropathy – possibilities of early laboratory diagnostics
and course prediction (review of literature)593

CYTOLOGY

- Tarlycheva A.A., Markova Zh.G., Yurchenko D.A., Shilova N.V.*
Optimization of the sperm processing protocol for subsequent molecular cytogenetic studies.603

IMMUNOLOGY

- Karzakova L.M., Kudryashov S.I., Borisova L.V., Zhuravleva N.V., Komelyagina N.A., Odintsova A.V., Sidorov I. A.*
Features of the immunological profile of blood and urine in patients
with post-infectious glomerulonephritis610
- Malyshkina A.I., Sotnikova N.Y., Grigushkina E.V., Kroshkina N.V., Talanova I.E.*
Prediction of the outcome of pregnancy in women with recurrent miscarriage618

MICROBIOLOGY

- Gerasimov V.N., Kharseeva G.G., Sherbataya O.S., Kotov S.A., Chepusova A.V.*
Peculiarities of the ultrastructure of mixed biofilms of the causing agent of diphtheria and conditionally
pathogenic microorganisms isolated from the human respiratory tract623
- Bocharova Yu.A., Savinova T.A., Lyamin A.V., Kondratenko O.V., Polikarpova S.V., Zhilina S.V., Fedorova N.I., Semykin S.Yu., Chaplin A.V., Korostin D.O., Mayansky N.A., Chebotar I.V.*
Genome features and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in patients
with cystic fibrosis in the Russian Federation629

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Petrashova D.A., Kolomeichuk S.N.*
Effect of angiotensin-I converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism on genome instability
in children living in Russian Arctic635

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Семёнова Н.В., Мадаева И.М., Колесникова Л.И.

АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В КРОВИ ЖЕНЩИН С ИЗБЫТОЧНОЙ МАССОЙ ТЕЛА В ПОСТМЕНОПАУЗЕ

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 664003, г. Иркутск, Россия

Одним из важных компонентов системы антиоксидантной защиты является система глутатиона, активность которой при избыточном весе меняет направленность в зависимости от гендерной и этнической принадлежности. Результаты исследований с участием женщин с избыточной массой тела и возрастным дефицитом эстрогенов не представляются однозначными. В исследовании приняли участие 61 женщина, находящиеся в постменопаузальном периоде, которые после клинико-anamnestического обследования были разделены на 2 группы: контроль (ИМТ = 19-24,9 кг/м²) и группа с избыточной массой тела (ИМТ = 25-29,9 кг/м²). Критериями исключения из исследования были: применение заместительной гормонотерапии, применение препаратов антиоксидантного ряда, заболевания эндокринного генеза, обострение хронических заболеваний, преждевременная ранняя менопауза, хирургическая менопауза. В крови определяли параметры липидного профиля с расчетом коэффициента атерогенности; уровни восстановленного и окисленного глутатиона с расчетом их соотношения, активность глутатион S-трансферазы и глутатионредуктазы. У женщин с избыточной массой тела выявлено повышение уровня триацилглицеролов ($p=0,041$) и холестерина в липопротеинах очень низкой плотности ($p=0,044$). При оценке активности системы глутатиона у женщин основной группы по сравнению с контролем отмечено повышение активности глутатион-S-трансферазы ($p=0,023$) и глутатионредуктазы ($p=0,022$), однако уровни восстановленного и окисленного глутатиона, а также их соотношение не отличаются от контрольных значений. Полученные результаты свидетельствуют об активации ферментативного звена системы глутатиона в ответ на изменения липидного статуса у женщин с избыточной массой тела, находящихся в постменопаузальном периоде.

Ключевые слова: постменопауза; глутатион; избыточная масса тела.

Для цитирования: Семёнова Н.В., Мадаева И.М., Колесникова Л.И. Активность системы глутатиона в крови женщин с избыточной массой тела в постменопаузе. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (10): 581-585.
DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-581-585>

Для корреспонденции: Семёнова Наталья Викторовна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патофизиологии; e-mail: natkor_84@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 09.02.21

Принята к печати 14.04.21

Semenova N.V., Madaeva I.M., Kolesnikova L.I.

GLUTATHIONE SYSTEM ACTIVITY IN THE BLOOD OF OVERWEIGHT POSTMENOPAUSAL WOMEN

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, 664003, Russian Federation

One of the important components of the antioxidant defense system is the glutathione system, the activity of which, when overweight, changes direction depending on gender and ethnicity. The results of studies involving overweight menopausal women are mixed. The study involved 61 postmenopausal women, who, after clinical and anamnestic examination, were divided into 2 groups: control (BMI = 19-24.9 kg/m²) and overweight group (BMI = 25-29.9 kg/m²). The use of hormone replacement therapy; the use of antioxidant drugs; diseases of endocrine genesis; exacerbation of chronic diseases; premature early menopause; surgical menopause was the exclusion criteria for women from the study. The lipid profile parameters with the calculation of the atherogenic coefficient; reduced and oxidized glutathione levels with the calculation of their ratio, the glutathione S-transferase and glutathione reductase activities were determined in the blood. Overweight women showed an increase in the triacylglycerols ($p = 0.041$) and cholesterol in very low density lipoproteins levels ($p = 0.044$). When assessing the glutathione system activity in women of the main group, compared with the control, an increase in the glutathione-S-transferase ($p = 0.023$) and glutathione reductase ($p = 0.022$) activities was noted, however, the reduced and oxidized glutathione levels, as well as their ratio did not differ from the control values. The results obtained indicate the activation of the glutathione system enzymatic link in response to changes in lipid status in postmenopausal women with overweight.

Key words: postmenopause; glutathione; overweight.

For citation: Semenova N.V., Madaeva I.M., Kolesnikova L.I. Glutathione system activity in the blood of overweight postmenopausal women. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (10): 581-585 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-581-585>

For correspondence: Semenova N.V., PhD, research scientist of the pathophysiology laboratory; e-mail: natkor_84@mail.ru

Information about authors:

Semenova N.V., <http://orcid.org/0000-0002-6512-1335>;

Madaeva I.M., <http://orcid.org/0000-0003-3423-7260>;

Kolesnikova L.I., <http://orcid.org/0000-0003-3354-2992>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 09.02.2021

Accepted 14.04.2021

Введение. Менопауза представляет собой естественный физиологический процесс, являясь при этом критическим периодом в жизни женщины в связи с инволюционной гормональной перестройкой, прежде всего гипоэстрогенией, способствующей развитию целого ряда расстройств [1]. Эстрогеновая недостаточность, нарастающая по мере прогрессирования менопаузы, может стать причиной увеличения веса, изменения липидного профиля [2-4], что в свою очередь может стать причиной интенсификации процессов липопероксидации, для инактивации токсичных продуктов которых в организме существует система антиоксидантной защиты (АОЗ) [5]. Результаты проведенных ранее исследований показали, что снижение антиоксидантного статуса в менопаузе может быть связано с возрастным снижением уровня эстрогенов, мелатонина, витаминов, глутатиона, активности антиоксидантных ферментов [3, 6–10]. Однако есть исследования, результаты которых демонстрируют повышение антиоксидантного статуса и снижение окислительного повреждения [11, 12].

Одним из наиболее важных гидрофильных антиоксидантов является глутатион. Его антиоксидантное действие реализуется за счет участия в работе антиоксидантных ферментов путем прямого взаимодействия с супероксидными радикалами, конкурируя с супероксиддисмутазой, а также самопроизвольно взаимодействуя с различными пероксидами и свободными радикалами органических соединений, образующихся под действием активных форм кислорода [13]. Более того, предполагается, что снижение клеточного глутатиона ниже порогового уровня составляет апоптотический сигнал, который инициирует активацию рецептора смерти или передачу сигналов митохондрией апоптоза [14]. Глутатион-опосредованное восстановление гидропероксидов требует ферментативного катализа глутатионпероксидазой. Глутатион S-трансферазы детоксифицируют ксенобиотические соединения, катализируя конъюгацию глутатиона с неполярными субстратами. После восстановления окислителей или детоксикации токсичных веществ глутатион переходит в окисленную форму, восстановление которой катализируется НАДФН-зависимой глутатионредуктазой и системой тиоредоксина [15]. Результаты проведенных ранее исследований по изучению активности глутатионовой системы при избыточном весе не представляются однозначными [16, 17] и требуют дальнейшего исследования проблемы для последующей разработки методов коррекции метаболических нарушений.

Целью данной работы явилась оценка активности системы глутатиона в крови у женщин с избыточной массой тела в постменопаузе.

Материал и методы. Исследование с участием женщин, находящихся в постменопаузальном периоде ($n=61$), было проведено на базе «Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека». Исследование соответствует этическим нормам Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964 г., последний пересмотр Форталеза, Бразилия, 2013 г.). Каждая женщина подписала информированное согласие на участие в проводимом исследовании.

Всем женщинам было проведено клинико-анамнестическое обследование, определение активности компонентов системы глутатиона. Для включения женщин в исследование были использованы следующие критерии: возраст старше 50 лет, отсутствие менструальной функции более 24 мес, тонкий нефункциональный эндометрий, М-эхо 0,3 см или меньше, отсутствие фолликулярного аппарата яичников, уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) >20 мЕд/мл, индекс лютеинизирующего гормона /ФСГ <1 [18].

Критериями исключения из исследования были: применение заместительной гормонотерапии, применение препаратов антиоксидантного ряда, заболевания эндокринного генеза, обострение хронических заболеваний; преждевременная ранняя менопауза, хирургическая менопауза.

В зависимости от индекса массы тела (ИМТ) женщины были разделены на две группы: контрольная ($n=21$) с нормальным весом (ИМТ = 19–24,9 кг/м²) и основная ($n=40$) с избыточной массой тела (ИМТ = 25–29,9 кг/м²).

Для проведения биохимических исследований была использована венозная кровь, забор которой проводили с 8.00 до 9.00 ч натощак в соответствии с общепринятыми требованиями. Кровь центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин., а эритроциты трижды промывали 0,9% NaCl. Определение параметров липидного профиля в сыворотке крови проводили немедленно. Плазму крови для определения активности глутатионредуктазы, глутатион S-трансферазы и эритроциты для определения уровня глутатиона хранили замороженными при -40°C , но не более одного месяца.

На спектрофлуориметре «SHIMADZU RF-1501» (Япония) определяли содержание восстановленного и окисленного глутатионов (GSH и GSSG, мкмоль/л) – методом P.J. Hisin и R. Hilf [19]. Активность глутатионредуктазы (усл.ед.) определяли спектрофлуориметрическим методом с использованием коммерческих наборов «Randox» (Великобритания) на автоматическом анализаторе «BTS-330» (Польша). Активность глутатион S-трансферазы (нг/мл) определяли иммуноферментным анализом с использованием наборов «ImmunDiagnostik» (Германия) на анализаторе «BioTek EL × 808» (США).

Параметры липидного обмена определяли согласно рекомендациям В.С. Камышникова [20] на анализаторе BTS-330 (Польша) с использованием коммерческих наборов Bio Systems (Испания).

Полученные данные обрабатывали в программе STATISTICA 10. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение ($m \pm \sigma$) (для возраста и ИМТ); медианы, первого и третьего квартилей ($Me [Q1; Q3]$) (для биохимических показателей). При анализе межгрупповых различий для независимых выборок использовали критерий Манна-Уитни (U-Test). Критический уровень значимости принимался за 5% (0,05).

Результаты. Параметры липидного профиля в исследуемых группах представлены в таблице. У женщин с избыточной массой тела выявлено достоверно значимое повышение уровня триацилглицеролов ($p=0,039$) и

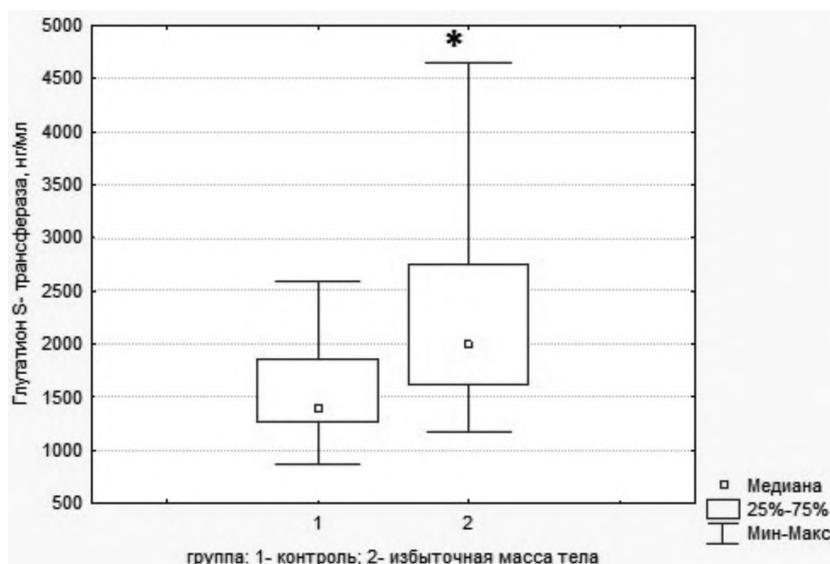


Рис. 1. Активность глутатион-S-трансферазы в исследуемых группах. Здесь и на рис. 2: * - статистически значимые различия между группами, $p < 0,05$.

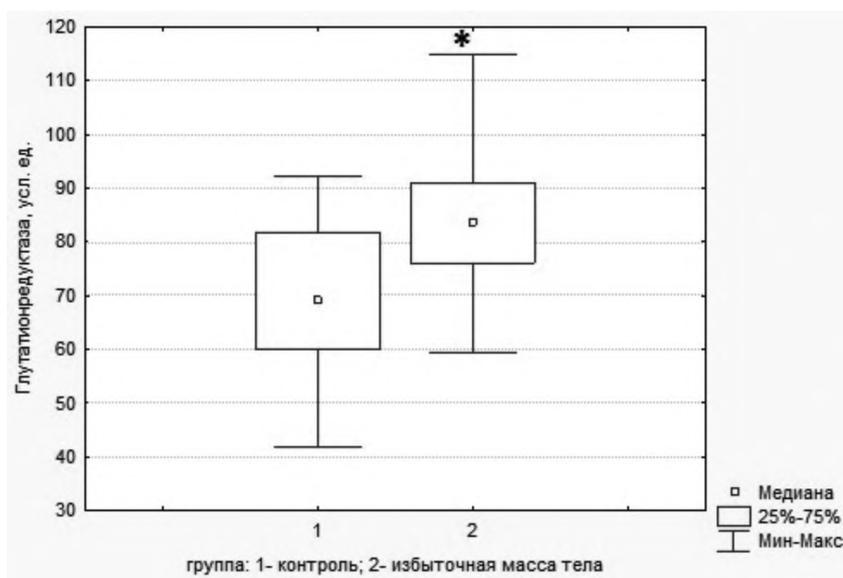


Рис.2. Активность глутатионредуктазы в исследуемых группах.

Основные характеристики и показатели липидного профиля в исследуемых группах

Показатель	Контроль, n=21	Избыточная масса тела, n=40
	<i>m ± σ</i>	
Возраст, годы	54,24±4,54	55,73±4,02
Рост, м	1,61±0,04	1,62±0,07
Вес, кг	60,16±5,87	70,27±6,35*
ИМТ, кг/м ²	22,95±1,63	27,08±1,31*
	Me [Q1;Q3])	
Общий холестерол, ммоль/л	4,91 [4,43; 5,33]	4,90 [4,09; 5,89]
Триацилглицеролы, ммоль/л	0,87 [0,65; 1,27]	1,01 [0,63; 1,55]*
Холестерол липопротеинов высокой плотности, ммоль/л	1,24 [1,04; 1,49]	1,15 [0,94; 1,35]
Холестерол липопротеинов низкой плотности, ммоль/л	3,35 [2,66; 3,59]	3,24 [2,67; 3,86]
Холестерол липопротеинов очень низкой плотности, ммоль/л	0,40 [0,30; 0,58]	0,49 [0,39; 0,81]*
Коэффициент атерогенности	2,90 [2,27; 4,44]	3,25 [2,51; 4,15]

Примечание. *- статистически значимые различия между группами ($p < 0,05$).

холестерола в липопротеидах очень низкой плотности ($p=0,044$).

При оценке активности системы глутатиона у женщин основной группы по сравнению с контролем отмечено повышение активности глутатион-S-трансферазы ($p=0,023$) (рис. 1) и глутатионредуктазы ($p=0,022$) (рис. 2).

Уровни восстановленного и окисленного глутатиона (2,64 [2,49; 3,19] и 1,94 [1,70; 2,41] соответственно) в группе женщин с избыточной массой тела не отличались от контрольных значений (2,59 [2,36; 3,09] и 1,83 [1,59; 2,18] соответственно). Наравне с этим, не выявлено достоверных различий по соотношению GSH / GSSG между основной группой и контролем (1,16 [1,09; 1,68] и 1,47 [1,36; 1,55] соответственно).

Обсуждение. Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют об изменении липидного профиля у женщин с избыточной массой тела в постменопаузе, что согласуется с рядом исследований [2, 3]. К настоящему времени было проведено несколько исследований влияния жировых отложений на антиоксидантный статус и развитие окислительного стресса [21-23]. Результаты большинства исследований демонстрируют корреляцию высокого уровня жира в организме с низкой антиоксидантной активностью и высоким окислительным стрессом [24-26], хотя в некоторых исследованиях показан противоположный эффект или отсутствие разницы [16,27,28]. Среди представленных работ мы не нашли исследований на выборке женщин, находящихся в постменопаузальном периоде и имеющих избыточную массу тела, что затрудняет сопоставимость полученных результатов.

Известно, что результатом окисления полиненасыщенных жирных кислот является образование высокотоксичных альдегидов, таких как транс-4-гидрокси-2-ноненаль и транс-4-оксо-2-ноненаль, образующих аддукты белков и ДНК. При избытке жировых отложений в организме происходит избыточное образование альдегидов, инактивация которых происходит посредством их конъюгации с глутатионом. Данная реакция катализируется глутатион S-трансферазой. Результаты данного исследования демонстрируют активацию ферментов, участвующих в работе глутатионовой системы, в ответ на изменения липидного профиля при избыточной массе тела, что может свидетельствовать о возможной интенсификации процессов липопероксидации с образованием токсичных альдегидов. В данном случае повышение активности глутатион S-трансферазы необходимо для процессов детоксикации, а глутатионредуктазы – для своевременного восстановления окисленной формы глутатиона. Учитывая контрольные уровни как восстановленной, так и окисленной форм глутатиона у женщин с избыточной массой тела в постменопаузе, можно предположить, что активность глутатион S-трансферазы и глутатионредуктазы достаточна для поддержания тиол-дисульфидного равновесия. Учитывая неогневаемые изменения в липидном метаболизме у женщин с наступлением менопаузы возможен факт активации ферментов глутатиона при избыточной массе тела в качестве защитной реакции на изменения липидного профиля в сторону накопления липопротеинов очень низкой плотности в постменопаузе. Дальнейшее повышение массы тела и уровня атерогенных фракций липопротеидов с развитием ожирения может повлечь более интенсивное образование продуктов липопероксидации, приводящее к истощению системы антиоксидантной защиты. Для

подтверждения этого необходимо провести дополнительное аналогичное исследование с участием группы женщин с ожирением, что является лимитацией настоящей работы.

Выводы:

1. Изменения липидного профиля у женщин с избыточной массой тела в постменопаузе обусловлены повышением уровня триацилглицеролов и холестерина в липопротеинах очень низкой плотности.

2. Избыточная масса тела у женщин в постменопаузе сопровождается тиол-дисульфидным равновесием с активацией ферментативного звена системы глутатиона.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-12, 14-17, 19, 21-28
см. REFERENCES)

2. Семёнова Н.В., Мадаева И.М., Даренская М.А., Гаврилова О.А., Жамбалова Р.М., Колесникова Л.И. Липидный профиль у женщин двух этнических групп в климактерическом периоде. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018; 3(3): 93-8.
13. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Колесников С.И. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16(4): 16-29.
18. Сухих Г.Т., Сметник В.П., Юренина С.В., Ермакова Е.И., Чернуха Г.Е., Якушевская О.В. Менопауза и климактерическое состояние у женщин. Клинические рекомендации. М.: НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова; 2016.
20. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. 3-е изд. М.: МЕДпресс-информ; 2009.

REFERENCES

1. Lumsden M.A., Sassarini J. The evolution of the human menopause. *Climacteric*. 2019; 22(2): 111-6.
2. Semenova N.V., Madaeva I.M., Darenkaya M.A., Gavrilova O.A., Zhabalova R.M., Kolesnikova L.I. Lipid profile in menopausal women of two ethnic groups. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018; 3(3): 93-8. (in Russian)
3. Taleb-Belkadi O., Chaib H., Zemor L., Azzedine F., Belkacem C., Khedidja M. Lipid profile, inflammation, and oxidative status in peri- and postmenopausal women. *Gynecol. Endocrinol.* 2016; 32(12): 982-5.
4. Do K.A., Green A., Guthrie J.R., Dudley E.C., Burger H.G., Dennerstein L. Longitudinal study of risk factors for coronary heart disease across the menopausal transition. *Am. J. Epidemiol.* 2000; 151(6): 584-93.
5. Coyoy A., Guerra-Araiza C., Camacho-Arroyo I. Metabolism regulation by estrogens and their receptors in the central nervous system before and after menopause. *Horm. Metab. Res.* 2016; 48: 489-96.
6. Cervellati C., Bergamini C.M. Oxidative damage and the pathogenesis of menopause related disturbances and diseases. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016; 54(5): 739-53.
7. Chen J.-T., Kotani K. Serum γ -glutamyltranspeptidase and oxidative stress in subjectively healthy women: an association with menopausal stages. *Aging Clin. Exp. Res.* 2015; 28(4): 619-24.
8. Ogunro P.S., Bolarinde A.A., Owa O.O., Salawu A.A., Oshodi A.A. Antioxidant status and reproductive hormones in women during reproductive, perimenopausal and postmenopausal phase of life. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 2014; 43(1): 49-57.
9. Singh S., Singh S., Kumar B. Oxidative stress and superoxide dismutase (SOD) activity in postmenopausal women. *Inter. J. Sci. Res.* 2016; 5(1): 819-21.
10. Kolesnikova L., Semenova N., Madaeva I., Sutura L.V., Solodova E.I., Grebenkina L.A. et al. Antioxidant status in peri- and postmenopausal women. *Maturitas*. 2015; 81(1): 83-7.
11. Victorino V.J., Panis C., Campos F.C., Cayres R.C., Colado-Simao A.N., Oliveira S.R. et al. Decreased oxidant profile and increased an-

- tioxidant capacity in naturally postmenopausal women. *Age (Dordr)*. 2013; 35:1411–21.
12. Wiacek M., Zubrzycki I.Z., Bojke O., Kim H.J. Menopause and age-driven changes in blood level of fat- and water-soluble vitamins. *Clin-macteric*. 2013;16(6): 689-99.
 13. Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Kolesnikov S.I. Free radical oxidation: a pathophysiologist's view. *Bulleten' sibirskoy meditsiny*. 2017; 16(4): 16-29. (in Russian)
 14. Circu M., Aw T.Y. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*. 2012; 1823(10): 1767-77.
 15. Wang X., Hai C. Redox modulation of adipocyte differentiation: hypothesis of Redox Chain and novel in sights in to intervention of adipogenesis and obesity. *Free Rad. Biol. Med*. 2015; 89: 99–125.
 16. Adenan D.M., Jaafar Z., Jayapalan J.J., Abdul Aziz A. Plasma antioxidants and oxidative stress status in obese women: correlation with cardiopulmonary response. *PeerJ*. 2020; 19(8): e9230.
 17. Langhardt J., Flehmig G., Klötting N., Lehmann S., Ebert T., Kern M. et al. Effects of weight loss on glutathione peroxidase 3 serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Obes. Facts*. 2018; 11(6): 475-90.
 18. Sukhikh G.T., Smetnik V.P., Yureneva S.V., Ermakova E.I., Chernukha G.E., Yakushevskaja O.V. Menopause and climacteric state in women. Clinical guidelines. [Menopauza i klimaktericheskoe sostojanie u zhenshhin. Klinicheskie rekomendatsii]. Moscow: NMIC AGP im. V.I. Kulakova; 2016. (in Russian)
 19. Hisin P.J., Hilf R. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem*. 1976; 74(1): 214–26.
 20. Kamyshnikov V.S. Reference book on clinical and biochemical research and laboratory diagnostics. [Spravochnik po kliniko-biohimicheskim issledovanijam i laboratnoj diagnostike]. 3rd ed. Moscow: MEDpress-inform; 2009. (in Russian)
 21. Savini I., Catani M.V., Evangelista D., Gasperi V., Avigliano L. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improved oxstate. *Int. J. Mol. Sci*. 2013; 14: 10497–538.
 22. Lubrano C., Valacchi G., Specchia P., Gnessi L., Rubanenko E.P., Shuginina E.A. et al. Integrated haematological profiles of redox status, lipid and inflammatoryprotein biomarkers in benign obesity and unhealthy obesity with metabolic syndrome. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015; 2015: 490613.
 23. Lechuga-Sancho A.M., Gallego-Andujar D., Ruiz-Ocaña P., Visiedo F.M., Saez-Benito A., Schwarz M. et al. Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress a represent from an early age. *PLoS ONE*. 2018; 13:e0191547.
 24. Amirkhizi F., Siassi F., Djalali M., Shahraki S.H. Impaired enzymatic antioxidant defense in erythrocytes of women with general and abdominal obesity. *Obes. Res. Clin. Pract*. 2014; 8(1):e26-34.
 25. Hermsdorff H.H.M., Puchau B., Volp A.C.P., Barros K.B., Bressan J., Zulet M.Á. et al. Dietary total antioxidant capacity is inversely related to central adiposity as well as to metabolic and oxidative stress markers in healthy young adults. *Nutrition & Metabolism*. 2011; 8:59.
 26. Jankovica A., Korac A., Srdic-Galic B., Buzadzic B., Otasevic V., Stancic A. et al. Differences in the redox status of human visceral and subcutaneous adipose tissues – relationships to obesity and metabolic risk. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2014; 63:661–71.
 27. Amaya-Villalva M.F., González-Aguilar G., Rouzaud-Sández O., Gorinstein S., Astiazarán-García H., Robles-Sánchez M. Obesity-related indicators and the irrelationship with serum antioxidant activity levels in Mexican adults. *Nutricion Hospitalaria*. 2015; 31:1989–95.
 28. Čolak E., Pap D., Nikolić L., Vicković S. The impact of obesity to antioxidant defense parameters in adolescents with increased cardiovascular risk. *J. Med. Biochem*. 2019; 39:1–9.

Мальцева Л.Д.¹, Лакомова Д.Ю.², Захарова Н.Б.², Гурова Т.С.¹, Морозова О.Л.¹

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава РФ (Сеченовский Университет), 119990, Москва, Россия;

² ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского» Минздрава РФ, 410112, г. Саратов, Россия

Высокая частота встречаемости, неблагоприятный прогноз, отсутствие методов диагностики начальных этапов развития острого повреждения почек (ОПП) у пациентов с COVID-19 (coronavirus disease 2019 – коронавирусное заболевание 2019) предопределяют актуальность выбранной темы. Целью обзора явился анализ литературы для поиска и обоснования выбора маркеров ранней диагностики ОПП на основе механизмов его формирования. Проанализированы результаты более двухсот работ следующих медицинских баз данных: РИИЦ, Scopus, The Cochrane Library, MEDLINE. Рассмотрены факторы риска развития и прогрессирования ОПП, такие как гипоксемия, повышение внутригрудного давления на фоне острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), артериальная гипертензия (АГ) с эндотелиальной дисфункцией, сахарный диабет. Раскрыты ключевые звенья патогенеза ОПП при COVID-19 как прямого цитопатического действием SARS-CoV-2, так и за счёт иммуноопосредованного (цитокининдуцированного) механизма. Обозначены различные методологические подходы к поиску и определению маркеров на основе анализа протеома и метаболома мочи. Выявлены перспективные направления в диагностике начальных этапов ОПП: определение маркеров повреждения проксимальных канальцев, как наиболее чувствительных к гипоксии, и метаболитов АТФ, отражающих начальные этапы расстройства энергетического обмена в эпителии канальцев. Для оценки прогноза течения патологии рассмотрена возможность одномоментного изучения ряда биомаркёров при помощи неинвазивных методов обследования. Идентификация высокочувствительных и специфичных маркёров начальных этапов развития ОПП позволит повысить точность диагностики, обосновать показания к раннему началу терапии, прогнозировать исход заболевания.

Ключевые слова: обзор; острое повреждение почек; коронавирусное заболевание 2019; факторы риска; протеом; метаболом; биомаркёры.

Для цитирования: Мальцева Л.Д., Лакомова Д.Ю., Захарова Н.Б., Гурова Т.С., Морозова О.Л. Потенциальные мишени для ранней диагностики острого повреждения почек у пациентов с COVID-19 (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (10): 586-592. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-586-592>

Для корреспонденции: Морозова Ольга Леонидовна, д-р. мед. наук, проф. каф. патофизиологии; e-mail: morozova_ol@list.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 18.04.2021

Принята к печати 22.04.2021

Maltseva L.D.¹, Lakomova D.Y.², Zakharova N.B.², Gurova T.S.¹, Morozova O.L.¹

POTENTIAL TARGETS FOR PRECLINICAL DIAGNOSTICS OF ACUTE KIDNEY INJURY IN COVID-19 PATIENTS (REVIEW OF LITERATURE)

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia (Sechenov University), 119990, Moscow, Russia;

²V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, 410112, Saratov, Russia

An relevance of the topic was defined by the high occurrence, unfavorable prognosis, lack of diagnostic techniques for early stages of acute kidney injury (AKI) disclosed in patients with COVID-19 (Coronavirus Disease 2019). Screening of medical literature for selection of AKI preclinical biomarkers was considered as main aim of this review. More than 200 publications from Russian Science Citation Index (RSCI), Scopus, The Cochrane Library, and MEDLINE were reviewed. Such risk factors as hypoxemia, increased intrathoracic pressure associated with Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), hypertension (HT) involving endothelial dysfunction, and Diabetes mellitus were considered to be associated with AKI. There were explicated cytopathic and immune-mediated (cytokine-induced) mechanisms of COVID-19 associated AKI pathogenesis. Multiple methodological approaches were defined for detection and identification of the biomarkers based on urine proteome and metabolome screening. Perspective ways in the preclinical diagnostics of AKI such as detection of the markers of injury of the hypoxia-sensitive proximal canaliculi and the ATP metabolites that reflect first stages of the energy metabolism disorder in the epithelium lining canaliculi were identified in this study. The instantaneous and non-invasive investigation of different markers was regarded as possible method of the prognostication. The accuracy of the diagnosis on the initial stages of AKI, substantiate for preventive start of therapy, and make projections on the disease's outcome will be improved due to the identification of high-sensitive specific biomarkers.

Key words: review; acute kidney injury; coronavirus disease 2019; risk factors; proteome; metabolome; biomarkers.

For citation: Maltseva L.D., Lakomova D.Y., Zakharova N.B., Gurova T.S., Morozova O.L. Potential targets for preclinical diagnostics of acute kidney injury in covid-19 patients (review of literature). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (10): 586-592 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-586-592>

For correspondence: Morozova O.L., Doctor of Medical Sciences, professor, department of Pathophysiology; e-mail: morozova_ol@list.ru

Information about authors:

Maltseva L.D., <https://orcid.org/0000-0002-4380-4522>;

Lakomova D.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7549-6915>;

Zaharova N.B., <https://orcid.org/0000-0001-9410-2240>;
Gurova T.S., <https://orcid.org/0000-0002-3003-4362>;
Morozova O.L., <https://orcid.org/0000-0003-2453-1319>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 18.04.2021

Accepted 22.04.2021

Введение. При тяжелых формах поражения лёгких, частота которых составила около 25%, основной мишенью для действия вируса явились почки [1]. Y. Cheng и соавт. [2] установили, что SARS-CoV-2 приводил к развитию ОПП, которое считали независимым фактором риска неблагоприятного исхода заболевания. Исследования показали, что частота ОПП у пациентов, инфицированных COVID-19, составляла 3-15% [3]. У пациентов с тяжелой инфекцией COVID-19 в отделениях интенсивной терапии (ОИТ) данный показатель повышался до 14,5–50%, а количество нуждающихся в заместительной почечной терапии (ЗПТ) – до 25% [4]. По последним данным частота ОПП среди поступающих в ОИТ достигала 80-89% [5]. Около 75% пациентов с COVID-19 госпитализировали уже с признаками ОПП, а именно с протеинурией и гематурией. Исключение из исследования больных с ранее установленным диагнозом «хроническая болезнь почек» (ХБП), позволило предположить вирусную этиологию ОПП [6]. Летальность среди пациентов находившихся на ЗПТ составила около 55%, а потребность в гемодиализе после выписки из стационара сохранялась у каждого третьего [7].

Используемые критерии диагностики нарушения почечной функции (повышение уровня креатинина и мочевины крови, наличие и уровни протеинурии и гематурии) неспецифичны и указывают на глубокое и необратимое поражение почек. Развитие ОПП можно предупредить ещё на этапе обратимых изменений, используя неинвазивные методы диагностики. Это позволит уменьшить показатели летальности, снизить число пациентов нуждающихся в ЗПТ, и, следовательно, в значительной мере снизить нагрузку на медицинских работников. Однако медленное внедрение этих методов диагностики в клиническую практику угрожает не только многочисленными человеческими жертвами, но и крупными экономическими потерями.

Цель обзора – поиск потенциальных мишеней для ранней диагностики ОПП у пациентов с COVID-19.

Факторы риска развития ОПП у пациентов с COVID-19. S. Reegarornratana и соавт. [8], анализируя результаты более двух сотен работ установили, что ОПП предопределяет тяжесть и исход любой патологии.

В качестве факторов риска развития ОПП у пациентов с COVID-19 рассматривались: гипоксемия, повышенное внутригрудное давление, обусловленные нарушением газообмена на фоне острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), артериальная гипертензия (АГ) и сахарный диабет [9,10]. Эндотелиальная дисфункция при повышении артериального давления приводила к системной вазоконстрикции с последующим развитием тяжёлой гипоксии с исходом в некроз [11].

Мнение относительно влияния ингибиторов АПФ (ангиотензин-превращающий фермент) на частоту развития и тяжесть ОПП неоднозначно. W.H. Liang и соавт. [10] установили, что ингибиторы АПФ (иАПФ) нарушали регуляцию почечного кровотока, приводя к гиповоле-

мии и возможному формированию преренальной формы ОПП. Однако, L.F. Buckley и соавт. [12] определили, что прекращение приёма иАПФ усугубляло течение АГ и приводило к нарушению функции почек вплоть до развития ОПП. H.R. Reynolds и соавт. [13] не выявили связи между приёмом иАПФ и тяжестью течения COVID-19.

Среди факторов риска развития ОПП у пациентов с COVID-19 рассматривали нефротоксическое действие рентгеноконтрастных препаратов, однако данный вопрос до настоящего времени не изучен [14].

Закономерными факторами риска ОПП считали наличие у пациента ХБП. Y. Cheng и соавт. [2] установили, что частота ОПП у больных с ХБП была достоверно выше, чем без ХБП. Пациенты, несмотря на благоприятный исход ОПП, нуждались в последующем динамическом наблюдении с целью своевременной регистрации признаков хронизации процесса. Однако более конкретных данных относительно рассматриваемого вопроса в литературе нет.

Учитывая высокие показатели общей летальности у пациентов с ОПП на фоне COVID-19, особое внимание исследователей направлено на анализ факторов риска госпитальной летальности. Q. Ruan и соавт. [15] доказали, что исходно повышенные уровни креатинина и мочевины в крови, протеинурия и гематурия – независимые факторы риска данного показателя. G. Pei и соавт. [6] определили, что протеинурия и гематурия регистрировались у 65,5% и 41,7% пациентов соответственно. При этом смертность больных с ОПП и выявленными изменениями в крови и моче была в 5,3 раз, а по некоторым данным в 9 раз выше, чем без ОПП. Установлено, что неблагоприятный исход возможен и после полного купирования лёгочной симптоматики и, вероятно, обусловлен повреждением почек, что требовало дальнейшего наблюдения [6].

Механизмы формирования ОПП у пациентов с COVID-19. Среди причин развития ОПП рассматривали: 1. повреждение проксимальных канальцев; 2. гломерулонефрита, микротромботическую ангиопатию; 3. преренальную азотемию и осложнения лечения COVID-19 [9].

Результаты большинства работ указывали на то, что наиболее частой причиной развития ОПП (более 60% всех случаев) явился острый канальцевый некроз (ОКН). В одной из работ на долю ОКН, гломерулярной ишемии и микротромботической ангиопатии приходилось 75, 15 и 11% соответственно [16]. H. Su и соавт. [17] показали, что повреждение канальцев наблюдалось во всех образцах почек при аутопсии, тогда как патологических изменений со стороны гломерул и данных за тромбоз капилляров установлено не было.

Острый канальцевый некроз. ОКН и повреждение гломерул могли быть обусловлены как прямым цитотоксическим действием SARS-CoV-2, так и за счёт иммуноопосредованного (цитокининдуцированного) механизма [17].

Прямое цитопатическое действие вируса. E. Gkogkou и соавт. [18], проведя молекулярно-генетическое ис-

следование выявили высокую экспрессию генов рецептора ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2 – ангиотензин-превращающий фермент 2) и TMPRSS (cellular transmembrane serine proteases – трансмембранная сериновая протеаза 2) в подоцитах и проксимальных канальцах, которая не уступала уровню экспрессии в других органах. Анализ секвенирования РНК тканей человека подтвердил высокую коэкспрессию генов ACE2 и TMPRSS2 в подоцитах и проксимальных тубулоэпителиальных клетках (ТЭК) [19]. Экспрессия гена рецептора ACE2 в почках была в 100 раз выше, чем в легочной и других тканях [19]. Эти данные свидетельствовали о высокой тропности SARS-CoV-2 к этим клеткам, что позволило рассматривать почки как потенциальную мишень для первичного повреждения при COVID-19, а не как осложнение основного заболевания [18]. В 43,9-63% случаев инфицирование SARS-CoV-2, в том числе с развитием ОПП сопровождалось выраженной протеинурией, генез которой не установлен [20]

Прямое цитотоксическое действие подтверждено обнаружением фрагментов гена РНК SARS-CoV2 при помощи иммуногистохимии и гибридизации почечной ткани при аутопсии [21]. В. Diao и соавт. [22] подтвердили полученные данные путём обнаружения белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 в почечных канальцах. Н. Su et al. [17] при помощи электронной микроскопии выявили скопления коронавируса частиц в эпителии почечных канальцев и подоцитах. Однако J.H. Ng и соавт. [23] установили, что SARS-CoV-2 редко идентифицировался с помощью иммуногистохимии или гибридизации, а электронная микроскопия – неинформативный метод диагностики. Последний базируется исключительно на морфологии и размере вирусных частиц, что создаёт сложности в дифференцировке их от нормальных клеточных структур.

Цитокининдуцированный системный воспалительный ответ. Внутриклеточная вирусная репликация приводила к активации инфламмасы, что сопровождалось массивной секрецией провоспалительных цитокинов. Последние приводили к пироптозу с последующим развитием CRS (cytokine release syndrome – синдром высвобождения цитокинов или «цитокиновый шторм») [24]. X.W. Pan и соавт. [19] подчеркнули, что именно цитокины повреждали здоровые ткани других органов, а не SARS-CoV-2.

Каждый из провоспалительных маркёров мог запустить или способствовать прогрессированию эндотелиальной и канальцевой дисфункции, тем самым участвуя в развитии и прогрессировании ОПП у пациентов с COVID-19 [26,27]. У этих больных неоднократно была выявлена повышенная сывороточная концентрация IL6 (Interleukin 6 – интерлейкин 6), что указывало на гипертрофическую реакцию в лёгких и почках с высоким риском исхода в ПОН [25].

Гломерулопатии и микротромботические ангиопатии. S. Kissling и соавт. [26] сообщили об очаговой гломерулопатии и определении в подоцитах вакуолей с многочисленными сферическими частицами, которые рассматривались в качестве вирусных включений. Z. Varga и соавт. [27] при аутопсии обнаружили преимущественную локализацию SARS-CoV-2 в эндотелии клубочках, однако сделать чёткие выводы о первичном повреждении вирусом гломерул или их вторичном повреждении на фоне ПОН не удалось. Это требовало экспериментальных работ по изучению биопсийного материала [28].

Исследование биоптатов почек у пациентов с ОПП на фоне COVID-19 позволило установить помимо ОКН выраженное повреждение гломерул с исходом в склероз [29]. Однако полное отсутствие вирусных частиц в структурах нефрона поставило под сомнение существование прямого цитотоксического действия SARS-CoV-2. По всей видимости, патологические эффекты вируса осуществлялись посредством провоспалительных цитокинов [29]. Генетический анализ и исследование цитокинового профиля сыворотки крови позволили выдвинуть предположение, что у данной категории пациентов повреждение гломерул обусловлено генетической предрасположенностью (экспрессия гена APOL1 (apolipoprotein L1 – аполипопротеин L1) и действием провоспалительных факторов: IL2, IL6, IL7, (Interleukin 2,6,7 – интерлейкин 2,6,7), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) [27]. Установлено, что внутрисосудистая коагуляция в гломерулярных капиллярах коррелировала с высокими сывороточными показателями IFN- α (Interferon- α – интерферон- α). Последний, в свою очередь, активируя экспрессию гена APOL1, приводил к так называемому «повторному удару» с массивным повреждением подоцитов [29].

Таким образом, доказана важная роль цитокинов в инициации, развитии и прогрессировании ОПП у пациентов с COVID-19, что даёт возможность использовать их в качестве молекулярных мишеней для ранней диагностики патологии.

Молекулярная диагностика ОПП у пациентов с COVID-19. Процесс должен быть автоматизирован, эффективен в соотношении «количество обнаруженных биомаркеров/продолжительность анализа», чувствителен к выбранным молекулам и иметь доступную себестоимость. Перспективный биомаркер – сочетать высокую специфичность к искомой патологии, иметь возможность раннего обнаружения, иметь спектр концентраций, позволяющий определить конкретную стадию повреждения и/или отследить реакцию пациента на терапию, быть получен из доступных образцов, взятых неинвазивным методом.

На декабрь 2020 г. не существует методов молекулярной диагностики (МД) почечных заболеваний (в данном случае – ОПП), которые бы отвечали всем заявленным требованиям [30].

Современные методы диагностики ОПП у пациентов с COVID-19. Отправными точками в диагностике ОПП у пациентов с COVID-19 в настоящее время остаются показатели креатинина и мочевины в биохимическом анализе крови [2]. Креатинин – функциональный биомаркер, уровень которого в крови повышается лишь спустя сутки после снижения скорости клубочковой фильтрации. Кроме того, у пациентов, чья функция почек исходно была снижена, определялось замедление роста показателей данного биомаркёра [29]. В ходе изучения роли плазменных факторов в диагностике ОПП, у больных с COVID-19 исходно высокий уровень креатинина и мочевины крови выявлен лишь в 15,5% и 14,1% соответственно [2].

Перспективной биологической жидкостью для определения повреждения почек является моча. Однако широкий спектр химического состава и разнообразный метаболит, который, во-первых, может быть не связан напрямую с исследуемой патологией, а во-вторых – находится под влиянием внешних и внутренних показателей (питания, образа жизни, водного баланса, возраста и

т.д.) ограничивают её использование. Наиболее распространенным способом обследования пациентов является общий анализ мочи. На ОПП при COVID-19 могут указывать протеинурия и/или гематурия, которые определялись в 44% и 26,7% случаев соответственно [2]. Однако данные изменения регистрировались на стадиях необратимого повреждения и не подходили для ранней диагностики.

Перспективные методы диагностики ОПП у пациентов с COVID-19. Протеомный анализ. Протеом – совокупность белков, транслированных из информационной РНК, или транскриптома. Протеомный анализ играет ведущую роль в поиске маркеров повреждения почек при COVID-19, так как большинство из них являются белками. Все из приведенных далее маркеров обнаруживаются в моче, но зачастую не при использовании масс-спектрометрии (МС), а с помощью ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay – иммуноферментным анализом).

На данный момент МС – многообещающий и точный метод в данной области. Представляет собой инструментальный метод определения структуры соединений посредством перевода вещества в ионизированное состояние, разделения образующихся ионов по величинам отношения массы к заряду и регистрации ионов каждого вида [31]. Главным преимуществом МС является возможность определять одновременно большое количество молекул на множестве проб за небольшой промежуток времени. Следовательно, есть возможность сделать комплексный анализ на все маркеры ОПП, а не на ограниченное количество, как в случае с ELISA. Кроме того последний метод является дорогим и неавтоматизированным.

Наибольший интерес представляет исследование полимеров с массой до 20-25 kDa, позволяющие наблюдать спектры высокого разрешения и не требующие предварительного фракционирования и очищения пробы от других низкомолекулярных соединений.

Среди известных полимеров, особое значение уделяют маркерам повреждения проксимальных канальцев, как наиболее чувствительных к гипоксии [32]: цистатин С, NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin – липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов), TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinases-2 – тканевой ингибитор металлопротеиназы-2), KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1 – молекула повреждения почек-1), L-FABP (liver-type fatty acid-binding protein – протеин печеночного типа, связывающий жирные кислоты), IL-18 (interleukin-18 – интерлейкин-18), IGFBP-7 (insulin-like growth factor binding protein – инсулиноподобный белок-7, связывающий фактор роста), NAG (N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза).

Цистатин С – внеклеточный ингибитор цистеиновых протеаз, полипептид, состоящий из 120 аминокислотных остатков и синтезирующийся всеми ядродержащими клетками организма. Цистатин С свободно фильтруется через клубочковую мембрану, однако в норме, в отличие от креатинина, полностью метаболизируется проксимальными ТЭК. Цистатин С плазмы крови является биомаркером дисфункции гломерулярного аппарата, а цистатин С мочи – дисфункции проксимальных ТЭК [33]. Так, H. Fattah и соавт. [33] показали, что данный фактор – оптимальный индикатор гломерулярной дисфункции при определении его в сыворотке крови. Однако повышение уровня цистатина С в биологических средах мог-

ло быть ассоциировано не только с ОПП, но и сепсисом и неблагоприятным клиническим исходом [34].

NGAL, также известный как липокалин-2, в норме стимулирует дифференцировку и структурную реорганизацию эпителия канальцев [35]. Уровень данного протеина значительно повышался в моче (uNGAL) в ответ на ишемическое и токсическое повреждение почки. При ОПП uNGAL, синтезируемый в дистальных частях нефрона, ингибировал бактериальный рост, связывал ионы железа, стимулировал пролиферацию клеток в данном сегменте и угнетал их апоптоз. NGAL, фильтруясь в гломерулах, реабсорбировался в проксимальных канальцах путем эндоцитоза с последующим расщеплением в лизосомах. Таким образом, увеличение концентрации данного маркера в моче могло указывать на повреждение проксимальных канальцев. Установлено, что уровни NGAL в сыворотке и моче коррелировали как с ОПП, так и с сепсисом и другими состояниями [35].

TIMP-2 с молекулярной массой 21 kDa – фермент, который экспрессируется преимущественно в клубочках и канальцах почки и участвует в блокировке клеточного цикла на уровне G1-фазы. Деление клеток почечных канальцев останавливалось на данном этапе преимущественно после ишемического повреждения, что подтверждалось высокой экспрессией TIMP-2 при ОПП [36].

TIMP-2 в биологических средах определялся вместе с IGFBP-7. Последний – белок, являющийся маркером стресса клетки в раннюю фазу повреждения канальцев. IGFBP-7 также может инициировать остановку G1-фазы, что блокирует деление потенциально поврежденной клетки. Возможен также и паракринный сигнальный эффект данного фактора на соседние клетки. Таким образом, данные белки, являясь маркерами остановки клеточного цикла, отражают острое и необратимое повреждение ТЭК. F. Husain-Syed и соавт. [36] установили, что IGFBP-7 и TIMP-2 могут выступать в качестве факторов риска прогрессирования ОПП у пациентов с COVID-19. Авторы доказали, что на начальной стадии ОПП мочевые уровни IGFBP-7 и TIMP-2 не отличались от нормальных показателей. Регистрация низких мочевых концентраций данных маркеров у пациентов без последующего прогрессирования ОПП подтверждало возможную распространенность субклинического повреждения почек при COVID-19 и требовало дальнейшего исследования. У пациентов со 2 и 3 стадией ОПП регистрировались высокие показатели этих маркеров. В ходе работы доказано, что у всех пациентов с исходными мочевыми уровнями TIMP-2 и IGFBP7 более 2 нг/мл 1 стадия ОПП неизбежно прогрессировала до 3-й стадии и требовала ЗПТ, менее 0,3 нг/мл – прогрессирования не наблюдалось [36].

Kidney injury molecule-1 (KIM-1) – трансмембранный гликопротеин, который не обнаруживается в нормальных тканях почек, однако высоко экспрессируется эпителием проксимальных канальцев при ишемии или токсическом повреждении. Гликопротеин является фосфатидилсериновым сквенджер-рецептором, который трансформирует эпителиальные клетки проксимальных канальцев в «полупрофессиональные» фагоциты для очистки просвета канальцев от апоптотического дебриса. Рост уровня мочевого KIM-1 регистрируется даже при небольшом повреждении почек (включая нефротоксическое действие), что позволяет использовать его для ранней диагностики ОПП. S.G. Cose и соавт. [37] в

ходе изучения биомаркеров повреждения почек (NGAL, IL-18, KIM-1 и L-FABP) в моче установили повышение только уровня KIM-1, что позволило им сделать выводы о решающем значении данного фактора в прогнозировании течения ОПП и исхода заболевания.

T. Luther и соавт. [38] помимо KIM-1 в моче определяли содержание цистатина C, NGAL и TIMP-2. Авторы выявили, что при поступлении уровень цистатина C был повышен в моче в 75% случаев, NGAL – 25%, KIM-1 и TIMP-2 – 67% и 50% соответственно. Таким образом, исходные мочевые показатели всех вышеуказанных биомаркеров были повышены у большинства пациентов, однако это не позволяло достоверно судить о степени повреждения почек. У пациентов находящихся в ОРИТ повышение концентрации этих маркеров в моче коррелировало с тяжестью ОПП [38].

L-FABP (12-16 kDa) – белок, который экспрессируется в тканях с активным метаболизмом жирных кислот. У здорового человека он практически не обнаруживается в моче. В почечной ткани L-FABP экспрессируется в проксимальных канальцах и появляется в моче в ответ на гипоксию. D. Katagiri и соавт. [39] показали, что L-FABP – биомаркер ОПП и ХБП. Уровень протеина в моче резко возрастал у пациентов с тяжёлой степенью повреждения почек, требующих ЗПТ или непосредственно перед летальным исходом.

NAG (140 kDa) – лизосомальный фермент, локализованный преимущественно в почечных канальцах и расщепляющий химические связи гликозидов и аминокислот. NAG не проходит через мембрану клубочка из-за высокой массы, а обнаружение его в моче свидетельствует о повреждении канальцев, либо о высвобождении лизосомальных ферментов без разрушения клеток. Прямая корреляция между повышением индекса NAG/креатинин и тяжестью течения ОПП указывала на возможность использования данного маркера в качестве фактора риска формирования и прогрессирования патологии [40].

IL-18 – провоспалительный цитокин, который секретируется различными антиген-презентирующими клетками. IL-18 – медиатор ишемического повреждения, который полностью метаболизируется в проксимальных канальцах и появляется в моче при их дисфункции. Мочевой уровень цитокина возрастает при ОКН и представляет собой предиктор неблагоприятного исхода в кардиохирургической практике. L.M. LeBlanc и соавт. [41] установили, что изменение количества цитокина в моче позволяло констатировать ОПП за 24 часа до подъёма креатинина в сыворотке и прогнозировать потребность в ЗПТ. Однако другими авторами установлено, что повышение концентрации IL-18 в моче указывало на низкий риск формирования ОПП, а также было характерно для сепсиса без повреждения почек [35].

Помимо вышеуказанных протеомных маркеров, особое внимание в диагностике ОПП уделяется определению в моче таких белков, как UMA (urine microalbumin – микроальбумин мочи), A1M (α 1-microglobulin – α 1-микроглобулин), u-Tr (urine transferrin – трансферрин мочи).

UMA (~21 kDa) – маркер для мониторинга прогрессирования диабетической болезни почек. Повышенный уровень UMA может указывать на повреждение проксимальных канальцев. Однако отсутствие специфичности для ОПП может ограничить его полезность.

A1M (~27 kDa) – плазменный протеин, который синтезируется в печени и выполняет роль иммунорегуля-

тора и антиоксиданта. A1M свободно проникает через гломерулярный фильтр и примерно на 99% реабсорбируется в проксимальных канальцах, где и метаболизируется. Таким образом, протеин может указывать на дисфункцию проксимальных канальцев [42].

u-Tr (~76.5 kDa) – β -глобулин, отвечающий за транспорт железа в организме. Синтезируется преимущественно в печени в виде апотрансферрина и обладает умеренным предиктивным значением в отношении тубулоинтерстициального склероза и атрофии канальцевого эпителия, а также является маркером нарушения клубочковой проницаемости.

X.W. Hong и соавт. [43] у пациентов с COVID-19 показали повышение уровней MA, A1M, Tr, Ig мочи при увеличении сывороточного креатинина и азота мочевины крови. Эти маркеры могут быть полезными для мониторинга функции почек. Однако из-за малого количества изученных в исследовании образцов требуется дальнейшее изучение их диагностической значимости.

Метаболомный анализ. Метаболом – совокупность всех низкомолекулярных (не более 1,5 kDa) веществ, входящих в состав клетки. Подходят для ранней диагностики ОПП при использовании МС, однако у пациентов с COVID-19 они менее специфичны и чувствительны по сравнению с протеомными показателями. Таким образом, целесообразно исследовать их в комплексе.

Для анализа метаболома, помимо МС, подходит и ЯМР-спектроскопия (спектроскопия ядерного магнитного резонанса) – метод, основанный на поглощении радиочастотного электромагнитного излучения ядрами образца с ненулевым магнитным моментом, помещенного в постоянное магнитное поле. К преимуществам последнего относятся простота подготовки образцов и быстрота анализа. Недостатком – относительно низкая чувствительность в сравнении с МС.

Среди низкомолекулярных мочевых маркеров, особое внимание уделяется: креатинину, мочевой кислоте, ADMA (asymmetric dimethylarginine – асимметричный диметиларгинин), АМФ (аденозинмонофосфат), гипоксантину, инозину.

Креатинин (~113 Da) – продукт распада креатинфосфата в мышечной ткани. Креатинин свободно проходит через гломерулярный фильтр и при минимальной реабсорбции экскретируется без значительных метаболических изменений [2]. Отслеживание уровня применяется для оценки функционального состояния почек. Однако изменение концентрации при ОПП происходит поздно и наблюдалось при других состояниях.

Мочевая кислота (~168 Da) – конечный продукт пуринового метаболизма, который подвергается клубочковой фильтрации. Снижение содержания мочевой кислоты в моче свидетельствует о нарушении данной функции.

ADMA (~202 Da) – метилированный аналог аргинина, который высвобождается в процессе метаболизма белка. Он элиминируется из крови путем экскреции в мочу и деградации под действием ферментов. Снижение уровня маркера в моче из-за нарушенной элиминации обуславливает повышение его содержания в крови. ADMA – эндогенный ингибитор NO-синтазы. Отрицательный эффект на NO-синтазу является причиной повышения ADMA в крови, что свидетельствует об эндотелиальной дисфункции и прогрессировании повреждения почек при COVID-19. Более того, ADMA накапливается в почках во время оксидативного стресса и путем ингиби-

рования NO-синтазы обостряет ишемическое повреждение. Основным субстратом для выработки NO является L-аргинин [44]. При эндотелиальной дисфункции концентрация L-аргинина намного превышает концентрацию NO-синтазы, однако при введении L-аргинина извне происходит увеличение скорости кровотока, наблюдается так называемый «L-аргининовый парадокс». Этот феномен осуществляется при наличии в клетках определенных концентраций свободного асимметричного ADMA, который в условиях *in vivo* конкурирует с аргинином на уровне транспортера NO-синтаз [44].

Относительно показателей истощения АТФ (АМФ, гипоксантин, инозин, цАМФ) известно, что гипоксия и нефротоксические агенты могут вызывать истощение внутриклеточного АТФ. Метаболиты АТФ посредством диффузии свободно выходят из проксимальных эпителиальных клеток, поэтому могут быть использованы в качестве маркеров нарушения метаболизма АТФ при ОПП. Кроме того, цАМФ, который продуцируется в почках в ответ на недостаток энергии, является мощным индуктором апоптоза [45].

Заключение. Высокая частота развития ОПП у пациентов с COVID-19 напрямую коррелирует с показателями госпитальной летальности, и требуют особого внимания к вопросам его диагностики. Существующие методы определения острого нарушения функции почек позволяют установить её снижение только на этапе клинических проявлений и необратимых изменений в более чем 50 % функционирующих нефронов. Установлено, что ведущая роль в индукции и прогрессировании ОПП при COVID-19 принадлежит цитокинопосредованному механизму. Учитывая вовлечение в процесс всех структур нефрона, исследование протеома и метаболома мочи с применением неинвазивных методов диагностики даст возможность идентифицировать как отдельные маркеры ОПП так и молекулярные комплексы. Продолжается активный поиск потенциальных молекулярных мишеней для регистрации начальных этапов развития ОПП у данной категории пациентов. Разработка панели высокочувствительных и специфичных биомаркеров повреждения почек позволит диагностировать ранние этапы ОПП, оценивать эффективность проводимой терапии и прогнозировать течение патологии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yang X., Yu Y., Xu J., Shu H., Xia J., Liu H. et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(5):475–481. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.
2. Cheng Y., Luo R., Wang K., Zhang M., Wang Z., Dong L. et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney International.* 2020;97(5):829–838. doi: 10.1016/j.kint.2020.03.005.
3. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395(10229):1054–1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
4. Zhang G., Hu C., Luo L., Fang F., Chen Y., Li J. et al. Clinical features and short-term outcomes of 221 patients with COVID-19 in Wuhan, China. *J. Clin. Virol.* 2020; 127:104364. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104364.
5. Fisher M., Neugarten J., Bellin E. Yunes M., Stahl L., Johns T.S. et al. AKI in hospitalized patients with and without COVID-19: a comparison study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2020; 31(9):2145–2157. doi: 10.1681/ASN.2020040509.

6. Pei G., Zhang Z., Peng J., Liu L., Zhang C., Yu C. et al. Renal involvement and early prognosis in patients with COVID19 pneumonia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2020; 31(6): 1157–65. doi: 10.1681/ASN.2020030276.
7. Ng J.H., Hirsch J.S., Hazzan A., Wanchoo R., Shah H.H., Malieckal D.A. et al. Northwell Nephrology COVID-19 Research Consortium. Outcomes Among Patients Hospitalized With COVID-19 and Acute Kidney Injury. *Am. J. Kidney Dis.* 2021; 77(2):204–215.e1. doi: 10.1053/j.ajkd.2020.09.002.
8. Peerapornratana S., Manrique-Caballero C.L., Gómez H., Kellum J.A. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int.* 2019;96:1083–1099. doi: 10.1016/j.kint.2019.05.026.
9. Grasselli G., Zangrillo A., Zanella A., Antonelli M., Cabrini L., Castelli A. et al. COVID-19 Lombardy ICU Network. Baseline characteristics and outcomes of 1591 patients infected with SARS-CoV-2 admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA.* 2020;323(16):1574–1581. doi: 10.1001/jama.2020.5394.
10. Imai Y., Parodo J., Kajikawa O., de Perrot M., Fischer S., Edwards V. et al. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA.* 2003;289(16):2104–12. doi: 10.1001/jama.289.16.2104.
11. Wang M., Hao H., Leeper N.J., Zhu L. Thrombotic Regulation from the Endothelial Cell Perspectives. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* 2018;38:90–95. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310367.
12. Buckley L.F., Cheng J.W.M., Desai A. Cardiovascular Pharmacology in the time of COVID-19: A focus on angiotensin converting enzyme 2. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2020;75(6):526–529. doi: 10.1097/FJC.0000000000000840.
13. Reynolds H.R., Adhikari S., Pulgarin C., Troxel A.B., Iturrate E., Johnson S.B. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors and risk of COVID-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(25): 2441–8. doi: 10.1056/NEJMoa2008975.
14. Gabarre P., Duma G., Dupont T., Darmon M., Azoulay E., Zafrani L. Acute kidney injury in critically ill patients with COVID-19. *Intensive Care Med.* 2020;46(7):1339–1348. doi:10.1007/s00134-020-06153-9.
15. Ruan Q., Yang K., Wang W., Jiang L., Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020;46(5):846–848. doi: 10.1007/s00134-020-05991-x.
16. Golmai P., Larsen C.P., DeVita M.V., Wahl S.J., Weins A., Rennke H.G. et al. Histopathologic and ultrastructural findings in post-mortem kidney biopsy material in 12 patients with AKI and COVID-19. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2020;31(9):1944–1947. doi:10.1681/ASN.2020050683.
17. Su H., Yang M., Wan C., Yi L.X., Tang F., Zhu H.Y. et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int.* 2020;98(1):219–227. doi: 10.1016/j.kint.2020.04.003.
18. Gkogkou E., Barnasas G., Vougas K., Trougakos I.P. Expression profiling meta-analysis of ACE2 and TMPRSS2, the putative anti-inflammatory receptor and priming protease of SARS-CoV-2 in human cells, and identification of putative modulators. *Redox Biol.* 2020;36:101615. doi: 10.1016/j.redox.2020.101615.
19. Pan X.W., Xu D., Zhang H., Zhou W., Wang L., Cui X. Identification of a potential mechanism of acute kidney injury during the COVID-19 outbreak: a study based on single-cell transcriptome analysis. *Intensive Care Med.* 2020;46(6):1114–1116. doi: 10.1007/s00134-020-06026-1.
20. Martinez-Rojas M.A., Vega-Vega O., Bobadilla N.A. Is the kidney a target of SARS-CoV-2? *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2020;318(6):F1454–F1462. doi: 10.1152/ajprenal.00160.2020.
21. Ding Y., He L., Zhang Q., Huang Z., Che X., Hou J. et al. Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J. Pathol.* 2004;203(2):622–30. doi: 10.1002/path.1560.
22. Diao B., Wang C., Wang R., Feng Z., Tan Y., Wang H. et al. Human kidney is a target for novel severe acute respiratory syn-

BIOCHEMISTRY

- drome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) *Infection*. 2020 doi: 10.1101/2020.03.04.20031120.
23. Ng J.H., Bijol V., Sparks M.A., Sise M.E., Izzedine H., Jhaveri K.D. Pathophysiology and Pathology of Acute Kidney Injury in Patients With COVID-19. *Adv. Chronic Kidney Dis*. 2020;27(5):365-376. doi: 10.1053/j.ackd.2020.09.003.
 24. Chousterman B.G., Swirski F.K., Weber G.F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin. Immunopathol*. 2017;39(5):517-528. doi: 10.1007/s00281-017-0639-8.
 25. Wu C., Chen X., Cai Y., Xia Jia'an, Zhou X., Xu S. et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med*. 2020;180(7):934-943. doi: 10.1001/jamainternmed.2020.0994.
 26. Kissling S., Rotman S., Gerber C., Halfon M., Lamoth F., Comte D. et al. Collapsing glomerulopathy in a COVID-19 patient. *Kidney Int*. 2020;98(1):228-231. doi: 10.1016/j.kint.2020.04.006.
 27. Varga Z., Flammer A.J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A.S. et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020;395(10234):1417-1418. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.
 28. Lerolle N., Nochy D., Guérot E., Bruneval P., Fagon J.Y., Diehl J.L. et al. Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Med*. 2010;36(3):471-8. doi: 10.1007/s00134-009-1723-x.
 29. Wu H., Larsen C.P., Hernandez-Arroyo C.F., Mohamed M.M.B., Caza T., Sharshir M. et al. AKI and Collapsing Glomerulopathy Associated with COVID-19 and APOL1 High-Risk Genotype. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2020;31(8):1688-1695. doi: 10.1681/ASN.2020050558.
 30. Summary of the advantages and disadvantages of various... [Electronic resource] // ResearchGate. URL: https://www.researchgate.net/figure/Summary-of-the-advantages-and-disadvantages-of-various-bio-fluids-The-figure-shows-the_fig2_341702537 (accessed: 06.12.2020).
 31. Awdishu L., Tsunoda S., Pearlman M., Kokoy-Mondragon C., Ghassemian M., Naviaux R.K. et al. Identification of Maltase Glucoamylase as a Biomarker of Acute Kidney Injury in Patients with Cirrhosis. *Crit. Care Res. Pract*. 2019; 2019: 5912804. doi: 10.1155/2019/5912804.
 32. Soveri I., Helmersson-Karlqvist J., Fellström B., Larsson A. Day-to-day variation of the kidney proximal tubular injury markers urinary cystatin C, KIM1, and NGAL in patients with chronic kidney disease. *Ren. Fail*. 2020;42(1):400-404. doi: 10.1080/0886022X.2020.1757463.
 33. Fattah H., Vallon V. Tubular Recovery after Acute Kidney Injury. *Nephron*. 2018;140(2):140-143. doi: 10.1159/000490007.
 34. Nejat M., Pickering J.W., Walker R.J., Westhuyzen J., Shaw G.M., Frampton C.M. et al. Urinary cystatin C is diagnostic of acute kidney injury and sepsis, and predicts mortality in the intensive care unit. *Crit. Care*. 2010;14(3):R85. doi: 10.1186/cc9014.
 35. Koyner J.L., Garg A.X., Coca S.G., Sint K., Thiessen-Philbrook H., Patel U.D. et al. TRIBE-AKI Consortium. Biomarkers predict progression of acute kidney injury after cardiac surgery. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2012;23(5):905-14. doi: 10.1681/ASN.2011090907.
 36. Husain-Syed F., Wilhelm J., Kassoumeh S., Birk H.W., Herold S., Vadász I. et al. Acute kidney injury and urinary biomarkers in hospitalized patients with coronavirus disease-2019. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2020;35(7):1271-1274. doi: 10.1093/ndt/gfaa162.
 37. Coca S.G., Nadkarni G.N., Garg A.X., Koyner J., Thiessen-Philbrook H., McArthur E. et al. TRIBE-AKI Consortium. First Post-Operative Urinary Kidney Injury Biomarkers and Association with the Duration of AKI in the TRIBE-AKI Cohort. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161098. doi: 10.1371/journal.pone.0161098.
 38. Luther T., Bülow-Anderberg S., Larsson A., Rubertsson S., Lipcsey M., Frithiof R. et al. COVID-19 patients in intensive care develop predominantly oliguric acute kidney injury. *Acta Anaesthesiol. Scand*. 2021;65(3):364-372. doi: 10.1111/aas.13746.
 39. Katagiri D., Ishikane M., Asai Y., Kinoshita N., Ota M., Moriyama Y. et al. Evaluation of Coronavirus Disease 2019 Severity Using Urine Biomarkers. *Crit. Care Explor*. 2020;2(8):e0170. doi: 10.1097/CCE.000000000000170.
 40. Sun D.Q., Wang T.Y., Zheng K.I., Targher G., Byrne C.D., Chen Y.P. et al. Subclinical Acute Kidney Injury in COVID-19 Patients: A Retrospective Cohort Study. *Nephron*. 2020;144(7):347-350. doi: 10.1159/000508502.
 41. LeBlanc L.M., Paré A.F., Jean-François J., Hébert M.J., Surette M.E., Touaibia M. Synthesis and antiradical/antioxidant activities of caffeic acid phenethyl ester and its related propionic, acetic, and benzoic acid analogues. *Molecules*. 2012;17(12):14637-50. doi: 10.3390/molecules171214637.
 42. Pugia M.J., Valdes R. Jr., Jortani S.A. Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement. *Adv. Clin. Chem*. 2007;44:223-45. doi: 10.1016/s0065-2423(07)44007-0.
 43. Hong X.W., Chi Z.P., Liu G.Y., Huang H., Guo S.Q., Fan J.R. et al. Characteristics of Renal Function in Patients Diagnosed With COVID-19: An Observational Study. *Front. Med (Lausanne)*. 2020;7:409. doi: 10.3389/fmed.2020.00409.
 44. Gambardella J., Khondkar W., Morelli M.B., Wang X., Santulli G., Trimarco V. Arginine and Endothelial Function. *Biomedicines*. 2020;8(8): 277. doi: 10.3390/biomedicines8080277.
 45. van Kempen TATG, Deixler E. SARS-CoV-2: influence of phosphate and magnesium, moderated by vitamin D, on energy (ATP) metabolism and on severity of COVID-19. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2021;320(1):E2-E6. doi: 10.1152/ajpendo.00474.2020.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Попыхова Э.Б., Иванов А.Н., Степанова Т.В., Лагутина Д.Д., Савкина А.А.

ДИАБЕТИЧЕСКАЯ НЕФРОПАТИЯ — ВОЗМОЖНОСТИ РАННЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЕЧЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

Медико-социальная значимость сахарного диабета определяется быстрым ростом частоты заболевания, а также ранним развитием инвалидизирующих и снижающих качество жизни макро- и микрососудистых осложнений в частности, развитием диабетической нефропатии (ДН), которая развивается у трети больных СД 1 и 2 типа. Она занимает лидирующие позиции среди причин смерти, уступая лишь заболеваниям сердечно-сосудистой системы и онкологии. В связи с этим выявление ДН на доклинической стадии представляет собой важную задачу, как с позиций профилактики, так и более благоприятного прогноза течения СД. В настоящем обзоре представлены данные о возможностях ранней диагностики ДН с использованием биомаркеров крови и мочи, а также информация об их диагностической и прогностической ценности. Проведен анализ интерпретации показателя микроальбуминурии при СД 1-го и 2-го типа. Кроме того, приводятся литературные данные последних лет об информативности определения маркеров повреждения подоцитов, о роли продуктов окислительного стресса, иммунновоспалительных факторов, фактора роста эндотелия сосудов в процессе возникновения и развития ДН. Обсуждается возможность их практического использования для диагностики ДН в клинической практике. Поиск литературы при написании настоящего обзора осуществляли по базам данных РИНЦ, CyberLeninka, Scopus, Web of Science, MedLine, PubMed за период с 2011 по 2021 гг. с использованием следующих ключевых слов: сахарный диабет, диабетическая нефропатия, маркеры диабетической нефропатии; повреждение почек, ранняя диагностика диабетической нефропатии.

Ключевые слова: сахарный диабет; диабетическая нефропатия; хроническая болезнь почек; биомаркеры диабетической нефропатии; повреждение почек; обзор.

Для цитирования: Попыхова Э.Б., Иванов А.Н., Степанова Т.В., Лагутина Д.Д., Савкина А.А. Диабетическая нефропатия — возможности ранней лабораторной диагностики и прогнозирование течения (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (10): 593-602. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-593-602>

Для корреспонденции: Попыхова Эра Борисовна, канд. биол. наук., ст. науч. сотр. центральной научно-исследовательской лаборатории; e-mail: PopykhovaEB@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Минздрава РФ «Разработка технологий медикаментозной и немедикаментозной коррекции микроциркуляторных нарушений при сахарном диабете, сопровождающемся абсолютной недостаточностью инсулина, в условиях эксперимента» (регистрационный номер АААА-А19-119021190053-0).

Поступила 20.04.2021

Принята к печати 12.05.2021

Popykhova E.B., Ivanov A.N., Stepanova T.V., Lagutina D.D., Savkina A.A.

DIABETIC NEPHROPATHY – POSSIBILITIES OF EARLY LABORATORY DIAGNOSTICS AND COURSE PREDICTION (REVIEW OF LITERATURE)

Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky, 410012, Saratov, Russia

The medical and social significance of diabetes mellitus is determined by a progressive increase in the incidence of the disease, as well as the development of disabling and reducing the quality of life of macro- and microvascular complications in patients of working age, in particular, with the development of diabetic nephropathy (DN), which develops in one third of patients with type 1 and 2 diabetes. DN is the third leading cause of death after diseases of the cardiovascular system and oncological pathologies. In this regard, the identification of DN at the early stages is an important task both from the standpoint of prevention and a more favorable prognosis of the course of diabetes. This review presents data on the possibilities of early diagnosis of DN using blood and urine biomarkers, as well as information on their diagnostic and prognostic value. The analysis of the interpretation of the indicator of microalbuminuria in type 1 and 2 diabetes was carried out. In addition, the literature data of recent years on the informative value of determining markers of podocyte damage, on the role of oxidative stress products, immune-inflammatory factors, and vascular endothelial growth factor in the process of the onset and development of DN are presented. The possibility of their practical use for the diagnosis of DN in clinical practice is discussed. The literature search for this review was carried out using the databases of the RSCI, CyberLeninka, Scopus, Web of Science, MedLine, PubMed for the period from 2011 to 2021. using the following keywords: diabetes mellitus, diabetic nephropathy, markers of diabetic nephropathy; kidney damage, early diagnosis of diabetic nephropathy.

Key words: diabetes mellitus; diabetic nephropathy; chronic kidney disease; biomarkers of diabetic nephropathy; kidney damage; overview.

For citation: Popykhova E.B., Ivanov A.N., Stepanova T.V., Lagutina D.D., Savkina A.A. Diabetic Nephropathy – possibilities of early laboratory diagnostics and course prediction (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (10): 593-602 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-593-602>

For correspondence: Popykhova E.B., Senior Research Assistant of the Central Scientific Research Laboratory; e-mail: PopykhovaEB@mail.ru

Information about authors:

Pohykhova E., <https://orcid.org/0000-0002-7662-4755> ;
Ivanov A., <https://orcid.org/0000-0003-4061-5221> ;
Stepanova T., <https://orcid.org/0000-0001-8439-8033> ;
Lagutina D., <https://orcid.org/0000-0001-6219-3846> ;
Savkina A., <https://orcid.org/0000-0003-2357-400x>.

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

Acknowledgment. *The study was performed in the framework of the state assignment of the «Saratov State Medical University named after V. I. Razumovsky» Ministry of Health of Russia «Development of technologies for drug and non-drug correction of microcirculatory disorders in diabetes mellitus, accompanied by absolute insulin deficiency, in experimental conditions» (registration number AAAA-A19-119021190053-0).*

Received 20.04. 2021

Accepted 12.05.2021

Введение. Сахарный диабет (СД) является широко распространенным заболеванием. Прошрое столетие вошло в историю диабетологии как период интенсивного развития представлений о патогенезе и этиологии, а также модернизации методов лечения СД [1]. Но, несмотря на это, в настоящее время, СД и его макро- и микро-сосудистые осложнения, в частности, диабетическая нефропатия (ДН), считаются хроническими неинфекционными заболеваниями, которые по скорости роста распространенности приобрели характер неинфекционной эпидемии [2,3]. Гломерулосклероз, развивающийся при диабетической нефропатии (ДН), вызывает нарушение фильтрационной функции почек, терминальной стадией развития которой является хроническая почечная недостаточность [4,5]. В связи с этим ранняя диагностика ДН на доклинической стадии представляет собой задачу, важность которой обусловлена определяющей ролью для профилактики, эффективности лечения и прогноза течения СД.

Существует несколько теорий, объясняющих патогенез ДН: метаболическая, гемодинамическая и генетическая [6]. Однако большинство исследователей сходятся во мнении о том, что важную роль в ее возникновении и прогрессии играет перманентная гипергликемия. Она, запуская “порочный круг” событий, являющихся ключевым звеном в возникновении и развитии ДН и включающий нарушения, обусловленные процессами гликозилирования белков, реакции окислительного стресса, а также субклиническое воспаление [3]. В настоящее время ДН не относится к фатальным осложнениям диабета, поскольку ее развитие можно предупредить [5]. Тем не менее, еще несколько десятилетий назад ее выявляли у каждого второго больного СД. Развитие протеинурии являлось первым лабораторным показателем ДН и свидетельствовало о необратимости патологического процесса в почках. При этом отсутствовали методы ее ранней диагностики [6]. В 1969 г. в своей работе Н. Кеен и соавт. [7] описал ДН на «до-протеинурической» стадии. Он впервые использовал термины «микроальбуминурии» (МАУ), т.е. увеличение экскреции альбумина с мочой в отсутствие протеинурии в клинических анализах мочи, и «макроальбуминурии», соответствующей понятию протеинурии. Также, им был предложен метод измерения альбуминурии (АУ), однако, в мировой практике не получил признание, как метод ранней диагностики ДН, лишь в 1980 году.

К настоящему времени разработано и стандартизировано достаточное количество способов лабораторной оценки экскреторной и фильтрационной способности почек. Тем не менее, ранняя диагностика ДН является

актуальной проблемой современной медицины. В последние годы исследования протеома мочи с использованием методов капиллярного электрофореза и масс-спектрометрии позволили идентифицировать в ней биомаркеры, прогнозирующие развитие ДН у больных СД на 5 лет раньше, появления АУ. В настоящее время получен набор высокочувствительных и специфических биомаркеров, который позволяет оценить функцию почек и прогнозировать развитие ДН [8,9].

В этой связи целью настоящего обзора являлось рассмотрение патогенетической и диагностической значимости маркеров ДН.

В процессе написания статьи использовались следующие базы данных: РИНЦ, CyberLeninka, Scopus, Web of Science, MedLine, PubMed за период с 2011 по 2021 гг. Поиск проводился по ключевым словам: сахарный диабет, диабетическая нефропатия, маркеры диабетической нефропатии; повреждение почек, ранняя диагностика диабетической нефропатии.

Микроальбуминурия при СД 1 и 2 типа. В настоящее время значительно расширились возможности диагностики ДН на доклинической стадии. И, хотя, МАУ по-прежнему является главным клиническим показателем и «золотым стандартом» лабораторной диагностики возникновения и прогрессирования ДН при СД (особенно при СД 1 типа), тем не менее, ее диагностическая значимость весьма ограничена. Все чаще в научной литературе появляется информация о более специфичных, чем МАУ биомаркерах-предикторах поражения почек при СД [3]. Ограниченная прогностическая ценность МАУ связана, прежде всего, с тем, что ее высокий уровень не всегда специфичен для повреждения почек, поскольку на концентрацию белка влияет множество не ренальных факторов (интенсивные физические нагрузки, диета с высоким содержанием белка, недостаточность кровообращения, артериальная гипертензия, инфекции мочевыделительного тракта и др.) [10]. Так, интерпретация показателя МАУ при СД 2 типа претерпела значительные изменения. Научно доказано, что при СД 2 типа МАУ не является специфическим тестом ДН, а свидетельствует о развитии эндотелиальной дисфункции и сердечно-сосудистой патологии [5]. Также, при СД 2 типа была продемонстрирована высокая вариабельность мочевого экскреции альбумина при последовательно выполненных измерениях, и было доказано, что его выделение с мочой не всегда ассоциировано с изменением фильтрационной функции почек, о чем свидетельствует низкая скорость клубочковой фильтрации (СКФ) на фоне нормаль альбуминурии [11].

Давно ведутся споры о том, что точнее описывает функциональное состояние почек: проницаемость по-

чечного фильтра или состояние фильтрационной функции почек. А. Krolewski [12] в своей работе показал, что у диабетических больных быстрое снижение СКФ на стадии нормоальбинурии является маркером-предиктором развития терминальной стадии ДН. Определить патогенетическую первопричину раннего прогрессирования ДН довольно трудно. Это предопределяет необходимость поиска и внедрения в практику маркеров-предикторов, позволяющих проводить раннюю диагностику ДН и мониторировать ее терапию и течение. Также, специалистами возлагаются определенные надежды на современные протеомные, пептидомные и метаболомные исследования мочи у диабетических больных, которые помогут выявить высокоспецифичные и чувствительные биомаркеры ДН [13].

Авторы предлагают различные классификации биомаркеров ДН [8,9], в соответствии с которыми можно выделить: 1) маркеры тубулярного повреждения; 2) гломерулярные маркеры и продукты обмена внеклеточного матрикса; 3) иммуновоспалительные факторы; 4) маркеры оксидативного стресса; 5) другие биомаркеры. Для ранней диагностики почечной дисфункции весьма перспективным является определение концентрации данных веществ в биологических жидкостях человека (кровь и моча).

Маркеры тубулярного повреждения. Определение в крови и моче концентрации маркеров тубулярного повреждения может быть весьма полезно в оценке повреждения почек на доклинической стадии развития ДН, поскольку эти маркеры позволяют диагностировать нарушение функции канальцевого аппарата почек вследствие развития ДН на доклинической стадии, т.е. до появления МАУ [14], а также хорошо зарекомендовали себя у пациентов с нормоальбинурической ДН.

Цистатин С – это белок синтезируемый всеми клетками организма. Малая молекулярная масса позволяет ему легко проходить через почечный фильтр и полностью выводиться почками. На уровень цистатина С в биологических жидкостях не оказывают влияние возраст, пол и мышечная масса [15]. Его уровень в крови коррелирует с тяжестью ренальной патологии [16]. Доказано, что цистатин С является более чувствительным маркером, по сравнению с креатинином, отражающим нарушение фильтрационной функции почек [8], особенно в случае умеренного снижения СКФ, когда отсутствует пропорциональность между креатинином и СКФ [16]. В этом случае используют формулы, позволяющие оценивать СКФ по концентрации цистатина С в крови, а не по уровню креатинина [16, 17].

При повреждении тубулярного аппарата весьма информативно определение уровня содержания цистатина С в сыворотке крови [9], в то время как повышение его концентрации в моче указывает на нарушение реабсорбции в проксимальных канальцах [15].

Данные о повышении уровня цистатина С у пациентов с МАУ, по сравнению с пациентами с нормоальбинурией представили авторы в работе [14]. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что цистатин С может быть использован в качестве прогностического маркера прогрессии ДН.

При СД 2 типа на стадии нормоальбинурии мочевого уровень цистатина С может быть использован в качестве, свидетельствующего о нарушении ренальной функции [15]. Другими авторами в работе [8] показана корреляция между содержанием цистатина С в сыво-

ротке крови, NAG в моче, активностью лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы и уровнем креатинина в сыворотке.

Таким образом, определение цистатина С в сыворотке и моче является весьма информативным показателем ранней диагностики нефропатии при СД 2 типа [14].

N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза (NAG, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) – это лизосомальный фермент с молекулярной массой порядка 150 кДа, обнаруживаемый во многих тканях организма. В почках NAG секретируется эпителием проксимальных канальцев и участвует в разрушении внеклеточного матрикса. Высокая молекулярная масса не позволяет NAG проходить через почечный фильтр. Повреждение тубулярного аппарата почек вызывает увеличение концентрации фермента в моче и коррелирует с тяжестью его повреждения [6].

Повышение уровня мочевого экскреция NAG на фоне нормоальбинурии и прогрессивное ее увеличение до проявления МАУ показана у пациентов СД 2 типа [17,18]. При СД 1 типа низкая мочевого экскреция NAG на фоне МАУ свидетельствует о регрессе альбинурии до нормы, в то время как повышенное содержание NAG в моче является предиктором прогрессии МАУ до макроальбинурии [14,15,18]. Таким образом, при СД 1 типа определение уровня NAG в моче служит информативным маркером развития ДН. В работе [17] была показана положительная взаимосвязь между уровнем мочевого экскрецией NAG, продолжительностью СД, уровнем гликированного гемоглобина и уровнем глюкозы крови натощак.

Нейтрофильный желатиназо-ассоциированный липокалин (NGAL, Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) – это белок семейства липокалинов весом 24 кДа, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов. В физиологических условиях NGAL синтезируется различными клетками организма. Он проходит через почечный фильтр и реабсорбируется в проксимальных канальцах. NGAL оказывает стимулирующий эффект на почечный эпителий при его повреждении, а также оказывает протекторный эффект при бактериальных инфекциях. Повреждение почечной ткани вызывает повышение уровня NGAL в крови, которое коррелирует с тяжестью патологии. С мочой экскретируется NGAL синтезируемый в дистальных отделах нефрона [15]. Повреждение почек ишемического и токсического генеза приводит к многократному увеличению экспрессии и экскреции NGAL с мочой, опережая на 24–48 часов повышение концентрации сывороточного креатинина. Это дало основание авторам предложить NGAL в качестве биомаркера острого почечного повреждения и предиктора возможной трансформации его в хроническую форму [19].

Мочевого уровень NGAL используют для оценки повреждения канальцев при СД. Повышение его экспрессии наблюдается у пациентов на доклинической стадии ДН на фоне нормоальбинурии [15].

При СД 1 типа высокий уровень NGAL в моче предшествует МАУ [20,21]. Повышение уровня NGAL в моче также наблюдается у пациентов, страдающих СД 2 типа на стадии нормоальбинурии, МАУ и макроальбинурии [15]. У пациентов с преддиабетом повышение мочевого уровня NGAL свидетельствует о развитии повреждения тубулярного аппарата почек [22]. При СД 2 типа определение концентрации NGAL в моче может быть весьма ценным прогностическим маркером развития ДН [8].

Молекула повреждения почек-1 (Kidney Injury Molecule-1, KIM-1) – это трансмембранный белок эпителия проксимальных канальцев, впервые описанный в 1998 г. Характерной особенностью KIM-1 является низкий уровень экспрессии в интактной почке и повышение экспрессии в первые 12 часов ишемического повреждения [9]. При этом его повышение не всегда ассоциировано с увеличением концентрации азота мочевины и креатинина в сыворотке крови [23]. Таким образом, KIM-1 — это маркер острого почечного повреждения, отражающий степень тубулярного нарушения. В настоящее время KIM-1 исследуется в качестве маркера повреждения почек при различных хронических заболеваниях.

Результаты исследований мочевой экскреции KIM-1 при СД незначительны. Так, при СД 2 типа наблюдается повышенное мочевое содержание KIM-1, при этом у пациентов с МАУ концентрация KIM-1 в моче выше, чем у пациентов с нормоальбуминурией [24, 25]. Другие авторы в работе [14] продемонстрировали отсутствие прогностической ценности определения KIM-1 в моче у больных СД 2 типа. Однако, у пациентов с СД 1 типа и МАУ низкий уровень KIM-1 и NGAL в моче являлись предикторами последующего регресса альбуминурии [8].

Альфа-1-микроглобулин (A1M) представляет собой белок с молекулярной массой 27 кДа, обнаруживаемый в различных жидкостях организма. Он свободно проходит через клубочковый барьер, и большая его часть реабсорбируется в проксимальных канальцах. Поэтому повышенный уровень A1M в моче является ранним признаком поражения проксимальных канальцев почек [9]. В частности показано [8,17], повышение мочевого уровня A1M при СД на фоне нормоальбуминурии по сравнению со здоровыми лицами, что свидетельствует о возможности использования A1M мочи в качестве маркера-предиктора развития ДН до стадии альбуминурии. Также было показано [27,28], что высокий уровень A1M в моче у больных СД положительно коррелирует с концентрацией альбумина мочи и цистатина С сыворотки крови и отрицательно с СКФ [28, 29]. На уровень A1M в моче оказывает влияние длительность течения диабета и гликемический контроль [9]. Повышение концентрации A1M в моче предшествует возникновению альбуминурии, это свидетельствует о том, что A1M можно использовать в диагностике возникновения и развития ДН у пациентов СД 2 типа [26]. Т.о., определение мочевого уровня A1M представляет собой неинвазивную диагностическую альтернативу для диагностики и мониторинга заболеваний мочевыводящих путей, то есть для раннего выявления канальцевых нарушений при ДН.

Ретинол-связывающий белок (RBP, retinol binding protein) и В-2-микроглобулин (B2-microglobulin) представляет собой белок складчатой структуры, способный специфически связывать ретиноиды, в частности витамин А. В2-микроглобулин – это поверхностный белок-антиген клеточных ядер [26]. В2-микроглобулин принимает участие в регуляции пролиферации лимфоцитов [18]. В связи с тем, что оба пептида реабсорбируются в проксимальных канальцах, в нормальных условиях их содержание в моче минимально [26].

Увеличение мочевой экскреции данных пептидов наблюдается при повреждении тубулярного аппарата почек [18]. В частности, показана прямая зависимость между уровнем содержания В2-микроглобулина и степенью ДН при СД 1 и 2 типов [8, 29]. В исследовании

[30] показано повышение мочевого уровня RBP и В2-микроглобулина при СД 1 типа по сравнению с концентрацией данных белков в моче у здоровых лиц, а также ассоциация между их мочевой концентрацией и продолжительностью диабета и уровнем гликемии.

Белок, связывающий жирные кислоты, печеночная форма (LFABP, liver-type fatty acid-binding protein) – это транспортный белок с молекулярной массой порядка 15 кДа. Он экспрессируется гепатоцитами и эпителием проксимальных и дистальных канальцев почек и участвует во внутриклеточном метаболизме и транспорте жирных кислот [18]. Предполагают, что LFABP в почках играет роль эндогенного антиоксиданта, подавляющего тубулоинтерстициальные нарушения [8]. Повреждение клеток проксимальных канальцев вызывает активацию гена LFABP, что приводит к увеличению его экспрессии вследствие чего усиливается экскреция LFABP с мочой [18]. При иммуногистохимическом окрашивании образцов биоптатов почек при люпус-нефрите и ДН было показано, что выделение в мочу LFABP связано со структурным и функциональным нарушением канальцев [8, 9].

Экспериментально была продемонстрирована корреляция между мочевой концентрацией LFABP и степенью тубулоинтерстициального повреждения при СД [18]. По мнению ряда авторов [8,17,18], мочевого уровня LFABP может быть полезен для прогнозирования течения острого почечного повреждения и перехода его в хроническую форму. Значительное повышение мочевого уровня этого белка при ДН позволяет рассматривать его в качестве маркера ранней диагностики почечной патологии при СД [9,31]. Показано, что LFABP, является более чувствительным, по сравнению с KIM-1 и NGAL, маркером снижения фильтрационной функции почек и не зависит от уровня альбуминурии [19,31]. R. Maeda и соавт. [18] показали, что мочевого уровня LFABP, а также соотношение альбумин/креатинин в моче может быть весьма полезно в оценке риска развития сердечно-сосудистых поражений на фоне ДН у пациентов с СД 2 типа, поскольку данные показатели положительно коррелировали с повышением сердечных маркеров и с отклонениями электрокардиограммы.

Гломерулярные биомаркеры и продукты обмена внеклеточного матрикса. Перманентная гипергликемия лежит в основе нарушения превращения компонентов внеклеточного матрикса, что в итоге приводит к развитию гломерулосклероза. Также нарушение деградации этих компонентов является патогенетической основой развития фиброза. В связи с этим, пристальное внимание исследователей приковано к продуктам обмена внеклеточного матрикса и они активно изучаются в качестве маркеров ДН.

Трансферрин мочи – это белок с молекулярной массой 76,5 кДа, который легко фильтруется через гломерулярный барьер почек [9].

Установлена взаимосвязь между мочевой экскрецией трансферрина и прогрессией ДН, а также положительная корреляция с альбумино-креатининовым соотношением и отрицательная с СКФ [8]. Повышенная концентрация этого маркера наблюдается при инсулинорезистентности, плохом гликемическом контроле и повышенном уровне триглицеридов [17].

В работе [14] показано, что у пациентов с МАУ мочевой уровень трансферрина был выше, чем у пациентов с нормоальбуминурией [8]. В тоже время показано, что у

пациентов с исходно высоким уровнем экскреции трансферрина с мочой МАУ развивалась чаще, чем у пациентов с нормальным его уровнем [8]. Другими авторами в работе [32] продемонстрировано повышение мочевого уровня трансферрина у пациентов с СД 2 типа на фоне нормоальбуминурии, которое коррелировало с высокой концентрацией церулоплазмينا и IgG, что дало основание авторам рассмотреть трансферрин в качестве маркера-предиктора ДН. Повышение содержания трансферрина в моче у пациентов с СД 2 типа также наблюдалось при сосудистой патологии: артериальной гипертензии и диабетической ретинопатии [32].

Иммуноглобулин G (IgG) в моче. Антитела IgG – представляют собой анионные белки плазмы с молекулярной массой порядка 150 кДа, которые трудно фильтруются гломерулярным аппаратом почки [8]. В исследовании [26] у пациентов с СД 2 типа на фоне нормоальбуминурии была показана повышенная мочевая экскреция IgG, церулоплазмينا, трансферрина и оросомукоида по сравнению со здоровыми лицами. Продемонстрировано [17], что при СД повышенная мочевая экскреция IgG коррелировала с клинической стадией ДН. У пациентов при нормоальбуминурическом диабете 2 типа повышение мочевой экскреции IgG являлось предиктором развития МАУ [8]. При этом, следует отметить, что скорость прогрессии МАУ была значительно выше у пациентов с повышенным уровнем IgG в моче, чем у пациентов с нормальным его содержанием, это свидетельствует о том, что определение концентрации IgG в моче может быть использовано в качестве маркера-предиктора развития ДН у нормоальбуминурических пациентов с диабетом 2 типа. Но, экскреция IgG с мочой может также наблюдаться и до стадии МАУ. Так, авторами в исследовании [33] обнаружено, что уровни трансферрина, церулоплазмينا и IgG в моче у пациентов СД с нормоальбуминурией были повышены, по сравнению со здоровыми лицами. Это указывает на то, что комплексное определение мочевого уровня альбумина, трансферрина, церулоплазмينا и IgG может быть использовано в качестве чувствительного к изменениям фильтрационной функции почек комплекса маркеров на до-протеинурической стадии развития ДН.

Иммуноглобулин M (IgM) и фибронектин в моче. Фибронектин — это высокомолекулярный белок, который является компонентом внеклеточного матрикса клубочкового аппарата почек [14]. IgM секретируется плазматическими клетками и является самым тяжелым антителом (молекулярный вес порядка 990 кДа) в крови у человека. Из-за большого молекулярного веса появление IgM в моче указывает на серьезный дефект селективности по размеру в стенке капилляров клубочков [34]. Результаты исследований мочевой экскреции IgM и фибронектина неоднозначны и требуется дальнейшее изучение информативности данных показателей и их вклада в патогенез нефропатии при СД. Однако, в ряде работ [8,9] была показана корреляция между нарушением функции почек у больных СД и высоким уровнем IgM и фибронектина в моче.

Церулоплазмин мочи. Церулоплазмин — это отрицательно заряженный медь-транспортующий сывороточный белок, который с трудом фильтруется через почечный фильтр [14]. Поэтому повышенное содержание в моче церулоплазмينا у пациентов с СД 2 типа с нормоальбуминурией дает основание рассмотреть его наряду с мочевым трансферрином и IgG в качестве мар-

кера-предиктора ДН [8,9,35]. По данным авторов работы [35] скорость мочевой экскреции церулоплазмينا взаимосвязана с прогрессией альбуминурии.

Коллаген IV типа (Type-IV collagen) – это фибриллярный белок с молекулярной массой порядка 540 кДа, участвующий в формировании мезангиального матрикса гломерулярного аппарата почек. Из-за большой массы коллаген не может преодолеть почечный фильтр. Известно 28 типов коллагена, но в качестве маркера-предиктора ДН большинство авторов рассматривает коллаген IV типа [36].

Гипергликемия запускает каскад метаболических, гемодинамических, иммуновоспалительных и профиброгенных процессов, способствующих избыточному накоплению коллагена IV типа, что вызывает склерозирование клубочкового аппарата почек. При этом показана тесная взаимосвязь между уровнем мочевой экскреции коллагена и фильтрационной функцией почек [14], а также степенью морфологических изменений тубулярного, гломерулярного аппарата почек и интерстиция [8,9]. Гистологическое исследование образцов биоптатов почек продемонстрировало [8,17], что накопление коллагена IV типа наиболее характерно для диабетического гломерулосклероза, чем для гломерулопатий другой этиологии. Показано, что аккумуляция коллагена IV типа предшествует развитию гипертрофии клубочков и гиперфильтрации на ранних стадиях ДН [8,37]. Также продемонстрировано увеличение его мочевой экскреции при СД [26, 8] и показана прямая взаимосвязь между уровнем мочевой экскреции коллагена IV типа и клинической стадией ДН [8,18]. По мнению ряда авторов, коллаген IV типа может быть более специфичным маркером ДН, чем МАУ, развитие которой связывают не только с ДН, но и с рядом других не ренальных патологий [9, 17].

Ламинин в моче. Ламинин это компонент клубочковой базальной мембраны. Его мочевая экскреция повышается при СД 2 типа даже на стадии нормоальбуминурии и коррелирует с мочевым уровнем NAG, A1M и коллагена IV типа [39].

Гликозаминогликаны в моче. Гликозаминогликаны – это компоненты базальной мембраны клубочков. Наибольший интерес из семейства глизаминогликанов при развитии почечной патологии представляет **гепарансульфат**. Отрицательно заряженные молекулы гепарансульфата препятствуют диффузии через почечный фильтр одноименно заряженного альбумина. Повреждение клубочкового аппарата почек и снижение уровня гепарансульфата приводит к потере отрицательного заряда мембраной и, как следствие, она становится проницаемой для альбумина и других белков. У пациентов с СД даже при нормоальбуминурии увеличивается содержание в моче гликозаминогликанов [40]. В работе [8] у больных СД продемонстрирована корреляция между концентрацией гепарансульфата в моче и мочевым уровнем уромодулина.

Простагландин-D-синтаза липокалинового типа (L-PGDS) — это биомаркер, отражающий повышенную проницаемость капилляров стенки клубочков [8]. Многими авторами он рассматривается в качестве маркера-предиктора поражения почек, а не в качестве раннего маркера ДН [41]

Матриксные металлопротеиназы (MMP, Matrix metalloproteinases) – это ферменты семейства цинк-зависимых эндопептидаз, участвующих в процессах

деградации внеклеточного матрикса. В настоящее время изучено более 30 MMP, которые характеризуются определенной молекулярной структурой, тканевой и субстратной специфичностью. Наиболее изученными являются MMP-2 и MMP-9. Они участвуют в разрушении компонентов внеклеточного матрикса и коллагена IV типа в почках. Ферментативная активность MMP регулируется тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMP). Нарушение баланса в системе синтеза и разрушения MMP служит патогенетической основой возникновения и развития целого ряда острых и хронических ренальных патологий [8, 17]. Длительное протекание диабета и неадекватный гликемический контроль вызывает снижение активности и скорости синтеза MMP [17]. Это в свою очередь провоцирует снижение скорости катаболизма продуктов внеклеточного матрикса и создает основу для фиброзного перерождения клубочкового аппарата и интерстиция почек [15].

В работах [42, 43] показана корреляция между мочевой экскрецией MMP-2 и MMP-9 и нарастанием активности хронического гломерулонефрита. Экспериментально на грызунах было продемонстрировано повышение мочевой экскреции MMP-2 при СД, однако не было выявлено связи между повышением активности фермента и развитием альбуминурии [9]. У пациентов СД 1 типа показана повышенная активность MMP-2 в моче, которая коррелировала с наличием гиперfiltrации и МАУ. В другом исследовании [42] при СД 1 типа с ДН было продемонстрировано повышение активности MMP-8 и MMP-14 в моче по сравнению со здоровыми лицами. На грызунах с индуцированным СД экспериментально было показано увеличение мочевой концентрации MMP-9 и NGAL, которое предшествовало развитию альбуминурии [43].

Таким образом, продемонстрирован сложный механизм взаимодействия в системе MMP и их специфических ингибиторов, лежащий в основе регуляции деградации компонентов внеклеточного матрикса, нарушение которого, особенно в условиях гипергликемии, способствует развитию и прогрессии фиброза клубочков и тубулоинтерстиция почек.

Иммуновоспалительные факторы. В последние годы показано, что в патогенезе ДН играют важную роль иммуновоспалительные реакции [9]. Современное понимание формирования и протекания воспалительного процесса основывается на изучении патогенетической роли в нем клеточных медиаторов воспаления, а именно цитокинов, которые играют ключевую роль в процессах воспаления и регенерации тканей, клеточной пролиферации и апоптоза [9,44,47]. Так, в последние годы пристальное внимание исследователей привлекает тесная взаимосвязь уровня провоспалительных цитокинов в крови и моче и выраженность изменений в почках при СД [8, 44].

Цитокины (cytokines) представляют собой небольшие пептидные молекулы, которые осуществляют короткодистантную регуляцию межклеточных и межсистемных взаимодействий. К цитокинам относятся различные типы интерлейкинов (IL, interleukins).

В 1991г. G. Hasegawa и соавт. [44] впервые доказали участие провоспалительных цитокинов в патогенезе ДН. Авторы продемонстрировали, что перитонеальные макрофаги, культивируемые с базальными мембранами клубочков от диабетических крыс, продуцировали бо-

лее высокий уровень провоспалительных цитокинов, а именно, фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) и IL-1, по сравнению с теми, которые культивировались с базальными мембранами клубочков от здоровых крыс. При этом наблюдалась взаимосвязь между уровнем цитокинов и прогрессией нефропатии, а также была обнаружена независимая корреляция между воспалением и экскрецией альбумина с мочой, что позволило предположить участие этих цитокинов в патогенезе ДН.

Установлено, что у больных СД 1 типа на стадии МАУ, повышается экскреция IL-1 β [39]. В исследовании [44] показано, что у больных СД 1 типа с нормоальбуминурией и МАУ мочевая экскреция IL-8 повышается по мере снижения функции почек. Показано, что у пациентов повышенный в несколько раз уровень экскреции двух или более провоспалительных цитокинов, по сравнению с пациентами с нормальным уровнем их экскреции, свидетельствует о высоком риске раннего снижения СКФ [8].

ФНО- α – это цитокин, который продуцируется моноцитами, макрофагами, Т-клетками, а также мезангиальными, гломерулярными, эндотелиальными, тубулярными и дендритными клетками. ФНО- α играет ключевую роль в возникновении и развитии реакции воспаления. Активация ядерного фактора транскрипции под действием ФНО- α , вызывает увеличение экскреции эндотелина-1 мезангиальными клетками почек, что в свою очередь приводит к активации процессов пролиферации и склероза в почечной ткани [45]. В мезангиальных клетках ФНО- α индуцирует активные формы кислорода, что приводит к изменению барьерной функции гломерулярной капиллярной стенки и повышает ее проницаемость для альбумина [46]. В экспериментальной модели ДН у крыс выявлено повышение экспрессии мРНК, кодирующей ФНО- α , и высокое содержание белка в гломерулярных клетках и клетках проксимальных канальцев [44]. Эти данные свидетельствуют о важной роли ФНО- α в возникновении и развитии ДН. Также, ФНО- α способен вызывать повреждение почечной ткани, апоптоз и некроз клеток [46], изменять внутриклубочковый кровоток, СКФ за счет гемодинамического дисбаланса между вазоконстрикторами и вазодилаторами, а также изменять проницаемость эндотелия.

Хемокины (Chemokines). Моноцитарный хемотаксисный белок-1 (MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1): ишемия почечной паренхимы при ДН запускает субклинический воспалительный процесс с возможным его исходом в нефросклероз. MCP-1 обеспечивает миграцию мононуклеаров и лейкоцитов в область воспаления, а также участвует в инициации и поддержании воспаления путем стимуляции выработки провоспалительных цитокинов. Так, показана повышенная экспрессия MCP-1 при СД обоих типов [17]. При СД 1 типа на фоне МАУ наблюдается повышенное, по сравнению со здоровыми лицами и диабетическими пациентами на стадии нормоальбуминурии, содержание MCP-1 в крови [47]. Также показана повышенная мочевая экскреция MCP-1 при СД 1 типа даже на фоне нормоальбуминурии и ее корреляция с клинической стадией АУ [48]. Таким образом, мониторинг мочевой экскреции MCP-1 может быть использован для оценки процесса фиброгенеза в интерстиции почек как при хронических нефропатиях, так и при их травматическом поражении [9, 26].

Орозомукоид (или альфа-1-кислый гликопротеин, UOER) — это гликопротеин, участвующий в воспалительных реакциях. Мочевой уровень орозомукоида значительно повышен у пациентов с ДН по сравнению со здоровыми лицами [9] и наблюдается прямая корреляция между его мочевой экскрецией и клинической стадией ДН [8]. Кроме того, показана прямая взаимосвязь между мочевой экскрецией орозомукоида и альбумина, а также сывороточным уровнем креатинина и С-реактивного белка [17]. Ряд авторов полагают [8,9], что повышенный мочевой уровень орозомукоида свидетельствует о высоком риске развития ДН.

4. Биомаркеры оксидативного стресса. Оксидативный стресс (ОС) — это состояние дисбаланса между про- и антиоксидантами в биологических системах (клетках, тканях и органах) в сторону преобладания оксидантов. Он способствует возникновению и развитию различных патологических состояний. В настоящее время является общепризнанным факт того, что ОС, инициированный гипергликемией, является важным патогенетическим звеном, в возникновении и развитии диабетических сосудистых осложнений. В частности, доказано, что ОС является ключевым звеном в патогенезе и прогрессии ДН [49].

8-оксо-7,8-дигидро-2'-деоксигуанозин (8-oxodG) — это маркер ОС. Известно, что при диабете ОС играет важную роль в прогрессии и самого СД, и его сосудистых осложнений, например таких как ДН [9,49]. Представляют интерес данные о корреляции между содержанием 8-oxodG, продукта окислительного разрушения ДНК в моче и лейкоцитах и тяжестью развития ДН [18]. В исследовании [49] авторы изучали, связано ли содержание 8-oxodG в моче или лейкоцитах с прогрессией ДН. Полученные ими экспериментальные данные подтвердили предположение о важной роли ОС в патогенезе ДН и о том, что уровень содержания 8-oxodG в моче может быть использован для прогнозирования развития и прогрессии ДН у больных СД.

5. Другие биомаркеры. Исследователями было предложено большое количество маркеров мочи для оценки ранних проявлений ДН. Некоторые из них введены в употребление только в последнее время.

Подоциты и маркеры их повреждения. Повреждение клеток-подоцитов, которые являются основными компонентами щелевой диафрагмы клубочков, вызывает повышение мочевой экскреции специфических подоцитарных белков — нефрина и подоцина. В работе [9] исследовалась нефринурия и подоцинурия у больных СД 1 и 2 типов на разных стадиях ДН. Было показано увеличение мочевой экскреции нефрина и подоцина у больных СД даже при нормоальбуминурии, по сравнению со здоровыми лицами. Имеются данные свидетельствующие о том, что при СД подоциты повреждаются раньше, чем нарушается проницаемость клубочкового фильтра [5]. Следовательно, определение концентрации в моче нефрина и подоцина может использоваться для диагностики ДН на доклинической стадии, а также для и мониторинга дисфункции гломерулярного аппарата при СД [32,55].

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor). СД вызывает повреждение тканей гипоксического генеза, что запускает процесс ремоделирования сосудистого русла в пораженном участке, которое в данном случае выполняет адаптивную функцию. Одним из важнейших регуляторов ангиогенеза является VEGF. Это цитокин, который играет ключевую роль в физиологическом ангиогенезе, одновременно принимает участие в процессах неоваскуляризации при патологии [51,52] и увеличивает проницаемость эндотелия [18]. На экспрессию VEGF оказывает влияние множество проангиогенных ростовых факторов (эпидермальный ростовой фактор, тромбоцитарный ростовой фактор и IL-1 и др.), а также на его продукцию влияет pH, уровень глюкозы, липопротеидов и другие метаболические факторы [53]. При СД доказано отрицательное влияние VEGF на барьерную функцию клубочкового аппарата почек, за счет повышения его проницаемости для белков и, таким образом, усугубления течения протеинурии [14]. Так, у пациентов с СД наблюдается повышенная мочевая экскреция VEGF даже на стадии нормоальбуминурии [8,9]. На стадии микро- и МАУ у пациентов с диабетом типа 1 наблюдается значительное увеличение экскреции VEGF с мочой [18]. Также, при СД 2 типа показано увеличение мочевой экскреции VEGF по мере прогрессии ДН [14]. В работе [54], авторами было показано повышение продукции VEGF у грызунов с экспериментальным СД.

Хроническая гипергликемия инициирует образование гипергликозилированных конечных продуктов (advanced glycosylation end products, AGE), которые накапливаются в почках и выделяются в мочу [9]. D. Walcher и соавт. [49] установили, что связывание AGE с рецептором (RAGE) приводит к выделению провоспалительных цитокинов эндотелиоцитами, что вызывает развитие микро- и макроангиопатий. Продукты AGE при ДН оказывают системное повреждение действие на эндотелий, что способствует снижению его барьерной функции для низкомолекулярных веществ, а также усиленному синтезу и экскреции прокоагулянтных факторов, которые вызывают тромботическую окклюзию капилляров и способствуют развитию коагулопатий [8]. Таким образом под действием AGE происходит нарушение внутрипочечной гемодинамики, что провоцирует возникновение и развитие гиперфильтрации [49]. В работе [14] проводили оценку диагностической значимости экскретируемых с мочой продуктов AGE, в качестве биомаркеров ДН у пациентов с СД 1 и 2 типа. Так, была установлена ассоциация между степенью альбуминурии и уровнем AGE, что позволило сделать вывод о том, что выделяемые в мочу продукты AGE, могут быть использованы в качестве биомаркеров, коррелирующих с альбуминурией при СД 1 или 2 типа, но не с гломерулярными нарушениями почечной функции.

Микро-РНК — это короткие (21–25 нуклеотидов) некодирующие молекулы РНК. Они выполняют функцию регулирования посттранскрипционной экспрессии генов и блокировании трансляции белков и/или способствуют разрушению матричной РНК (мРНК). В настоящее время известно пять специфических для ренальной патологии микро-РНК, которые классифицируются по месту синтеза — преимущественно в корковом слое и преимущественно в мозговом. Их количественное определение в моче и крови может быть использовано для ранней диагностики ДН [55]. Молекулярные механизмы, инициирующие развитие ДН, у разных пациентов различны, поэтому для специалистов представляет определенный интерес исследование у каждого пациента индивидуального профиля микро-РНК, поскольку это может способствовать развитию персонализированного подхода к диагностике и мониторингу лечения ДН.

М. Kato и соавт. [56] в своей работе впервые показал взаимосвязь между уровнем микро-РНК и развитием ДН. Им было экспериментально установлено, что уровень микро-РНК-192 у животных со стрептозотоцин-индуцированным СД выше, чем у здоровых особей [56]. Более подробное исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляции ренальной функции позволило использовать микро-РНК в качестве маркера, отражающего нарушение функции почек, в т.ч. при СД, на ранней доклинической стадии [55].

Было показано [35], что при СД 2 типа на фоне ДН уровень мочевого экскреции микро-РНК-133b, микро-РНК-342 и микро-РНК-30a повышен и, при этом, наблюдалась прямая зависимость между повышенной экспрессией данных микро-РНК и высоким уровнем гликированного гемоглобина, холестерина липопротеинов низкой плотности, креатинина, систолического АД, соотношением альбумин/креатинин в моче и расчетной СКФ. Изменение экспрессии микро-РНК в экзосомах мочи свидетельствовало об изменениях на молекулярном уровне, которые предшествовали появлению альбуминурии.

Разработка и внедрение новых методов лечения СД и ДН на основе регуляции синтеза отдельных белков (инсулина, провоспалительных цитокинов, факторов роста и др.), которое возможно осуществить с помощью микро-РНК многим специалистам представляются весьма перспективными [56].

Заключение. В настоящее время возможности диагностики и прогнозирования развития диабетического поражения почек существенно расширились и позволяют диагностировать их на доклинической стадии. Теперь, используя методы молекулярной диагностики можно прогнозировать риск развития нефропатии до появления МАУ (эталонного маркера ДН). При этом для повышения точности ранней диагностики, персонализированной терапии и профилактики ДН клиническое обследование пациентов должно включать оптимальную комбинацию биомаркеров, которая отражает патологические процессы в гломерулярном и/или тубулярном отделах почек, либо свидетельствует о поражении интерстиция. Вместе с тем клиническая значимость некоторых потенциальных маркеров ДН нуждается в уточнении. Усилия по диагностике ДН на доклинической стадии необходимы для выделения среди пациентов с СД групп высокого риска развития нефропатии для того, чтобы была возможность выбора эффективной превентивной персонализированной терапии с использованием современных сахароснижающих препаратов с нефропротекторным эффектом.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4, 7-9, 11, 12, 14, 15, 18, 20-22, 24-44, 47-49, 55 см. REFERENCES)

1. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. Сахарный диабет в Российской Федерации: распространенность, заболеваемость, смертность, параметры углеводного обмена и структура сахароснижающей терапии по данным федерального регистра сахарного диабета, статус 2017 г. *Сахарный диабет*. 2018;21(3):144-59.
2. Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета. *Сахарный диабет*. 2017;20(1):13-41.
3. Шестакова М.В., Шамхалова М.Ш., Ярек-Мартынова И.Я., Клиффортова И.И., Сухарева О.Ю., Викулова О.К. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек: достижения, нерешенные про-

блемы и перспективы лечения. *Сахарный диабет*. 2011;(1):81-8. doi: 10.14341/2072-0351-6254.

5. Шестакова М.В. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек: возможности прогнозирования, ранней диагностики и нефропротекции в XXI веке. *Терапевтический архив*. 2016;6:84-8. doi:10.17116/terarkh201688684-88.
6. Маркова Т.Н., Садовская В.В., Беспятова М.Ю. Современные возможности диагностики хронической болезни почек при сахарном диабете. *Сахарный диабет*. 2017; 20(6): 454-60. doi: 10.14341/DM9268.
10. Захарова Н.Б., Пастушкова Л.Х., Ларина И.М., Каширина Д.Н., Лях Р.Н., Попков В.М. Значение протеомного состава мочи при заболеваниях мочевыводящих путей (обзор литературы). *Экспериментальная и клиническая урология*. 2017;(1):22-9.
13. Сучков С.В., Гнатенко Д.А., Костюшев Д.С., Крынский С.А., Пальцев М.А. Протеомика как фундаментальный инструмент доклинического скрининга, верификации анализов и оценки применяемой терапии. *Вестник РАМН*. 2013; (1): 65-71. https://doi.org/10.15690/vramn.755.
16. Вельков В.В. Цистатин С и NGAL — маркеры преклинической ренальной дисфункции и субклинического острого повреждения почек. *Лабораторная служба*. 2015;2:38-43. doi:10.17116/labs20154238-43.
17. Лебедева Н.О., Викулова О.К. Маркеры доклинической диагностики диабетической нефропатии у пациентов с сахарным диабетом 1 типа. *Сахарный диабет*. 2012;(2):38-45.
19. Еремеева А.В., Длин В.В., Корсунский А.А., Зайкова Н.М., Бондаренко Е.Д. Клиническое значение определения липокалина-2, ассоциированного с нейтрофильной желатинолизой, у пациентов с хронической болезнью почек (обзор литературы) *Нефрология*. 2018;22(4):50-6. DOI:10.24884/1561-6274-2018-22-4-50-56.
23. Уразаева Л.И., Максудова А.Н. Биомаркеры раннего повреждения почек: обзор литературы. *Практическая медицина*. 2014; 1(4):125-30.
45. Куценко Л.В., Зорин И.В., Вялкова А.А. Патогенетические механизмы формирования нефропатии при сахарном диабете 1 типа. *Лечащий врач*. 2018;6:58-61.
46. Ракитянская. И.А., Рябов С.И., Азанчевская С.В., Рябова Т.С., Попова В.Б., Черноуцкая Е.И. и др. Роль фактора некроза опухоли-альфа в развитии диабетической нефропатии у больных сахарным диабетом 2-го типа. *Клиническая больница*. 2014;1(07):20-5.
50. Попыхова Э.Б., Степанова Т.В., Лагутина Д.Д., Кириязи Т.С., Иванов А.Н. Роль сахарного диабета в возникновении и развитии эндотелиальной дисфункции. *Проблемы эндокринологии*. 2020;66(1):47-55. https://doi.org/https://doi.org/10.14341/probl12212.
51. Никольский Ю.Е., Чехонацкая М.Л., Захарова Н.Б., Попыхова Э.Б., Понукалин А.Н. Магнитно-резонансная томография и биомаркеры сыворотки крови и мочи в диагностике рака почки. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2016; 12(1):52-6.
52. Ребров А.П., Захарова Н.Б., Попыхова Э.Б. Биомаркеры воспаления и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) как факторы прогноза у больных раком молочной железы (РМЖ). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(9):39.
53. Пронина Е.А., Масляков В.В., Степанова Т.В., Попыхова Э.Б., Иванов А.Н. Анализ механизмов регенерации при аутоотрансплантации. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2019;27(3):393-406. DOI:10.23888/PAVLOVJ2019273393-406.
54. Попыхова Э.Б., Иванов А.Н., Степанова Т.В., Пронина Е.А., Лагутина Д.Д. Взаимосвязь нарушений углеводного обмена и маркеров дисфункции эндотелия у животных с абсолютной недостаточностью инсулина при биостимуляции аутоотрансплантацией кожного лоскута. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2019; 15(2):379-82.
56. Камышова Е.С., Бобкова И.Н., Кутырина И.М. Современные представления о роли микроРНК при диабетической нефропатии: потенциальные биомаркеры и мишени таргетной терапии. *Сахарный диабет*. 2017;20(1):42-50 doi: 10.14341/DM8237.

REFERENCES

1. Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulova O.K. Diabetes mellitus in Russian Federation: prevalence, morbidity, mortality, parameters of glycaemic control and structure of glucose lowering therapy according to the federal diabetes register, status 2017. *Sakharnyi diabet.* 2018;21(3):144-59. (in Russian)
2. Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulov O.K. Epidemiology of diabetes in the Russian Federation: clinical and statistical analysis according to the Federal register of diabetes. *Sakharnyi diabet.* 2017;20(1):13-41. (in Russian)
3. Shestakova M.V., Shamkhalova M.S., Yarek-Martynova I.Y., Klefortova I.I., Sukhareva O.Y., Vikulova O.K. Diabetes mellitus and chronic kidney disease: achievements, unresolved problems, and prospects for therapy. *Sakharnyi diabet.* 2011;(1):81-8. (in Russian)
4. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 7 ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2019.
5. Shestakova M.V. Diabetes mellitus and chronic kidney disease: Possibilities of prediction, early diagnosis, and nephroprotection in the 21st century. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2016;6:84-8. (in Russian)
6. Markova T.N., Sadovskaya V.V., Bespyatova M.Y. Modern methods of diagnosing chronic kidney disease in patients with diabetes mellitus. *Sakharnyi diabet.* 2017;20(6):454-60. (in Russian)
7. Viberti G., Karalliedde J. Commentary: The birth of microalbuminuria: a milestone in the history of medicine. *Int. J. Epidemiol.* 2014;43(1):18-20.
8. Gluhovschi C., Gluhovschi G., Petrica L., Timar R., Velcirov S., Ionita I. et al. Urinary Biomarkers in the Assessment of Early Diabetic Nephropathy. *J. Diabetes Res.* 2016;2016:4626125. doi: 10.1155/2016/4626125.
9. Uwaezuoke S.N. The role of novel biomarkers in predicting diabetic nephropathy: a review International. *Int. J. Nephrol. Renov. Dis.* 2017;10:221-31.
10. Zakharova N.B., Pastushkova L.H., Larina I.M., Kashirina D.N., Lyah R.N., Popkov V.M. The importance of the proteomic composition of urine in urinary tract diseases (review of literature). *Experimental'naya i klinicheskaya urologiya.* 2017;(1): 22-9. (in Russian)
11. Tuttle K.R., Bakris G.L., Bilous R.W. Diabetic Kidney Disease: A Report From an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care.* 2014;37:2864-883.
12. Krolewski A.S. Progressive renal decline: the new paradigm of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2015;38(6):954-62.
13. Suchkov S.V., Kostushev D.S., Krynskiy S.A., Gnatenko D.A., Paltsev M.A. Proteomics as a fundamental tool for subclinical screening, tests verification and assessment of applied therapy. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2013; (1): 65-71. (in Russian)
14. Currie G., McKay G., Delles C. Biomarkers in diabetic nephropathy: Present and future. *World J. Diabetes.* 2014;5(6):763-76.
15. Satirapoj B. Tubulointerstitial Biomarkers for Diabetic Nephropathy. *J. Diabetes Res.* 2018;3:1-6. Article ID 2852398. https://doi.org/10.1155/2018/2852398.
16. Velkov V.V. Cystatin C and NGAL — the Markers of Preclinical Renal Dysfunction and Subclinical Acute Kidney Injury. *Laboratornaya sluzhba.* 2015;2:38-43. (in Russian)
17. Lebedeva N.O., Vikulova O.K. Pre-clinical markers for diagnosis of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *Sakharnyi diabet.* 2012;(2):38-45. (in Russian)
18. Lousa, I., Reis F., Beirão I., Alves, R., Belo L., Santos-Silva A. New Potential Biomarkers for Chronic Kidney Disease Management—A Review of the Literature. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 43. https://dx.doi.org/10.3390/ijms22010043.
19. Ereemeeva A.V., Dlin V.V., Korsunsky A.A., Zaikova N.M., Bondarenko E.D. Clinical significance of determination of lipocalin-2 associated with neutrophilic gelatinase in patients with chronic kidney disease (literature review). *Nefrologiya.* 2018; 22(4): 50-6. (in Russian)
20. Yıldırım Z.Y., Nayır A., Yılmaz A., Gedikbas A., Bundak R. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as an early sign of diabetic kidney injury in children. *J. Clin. Res. Pediatr Endocrinol.* 2015;7(4): 274-9.
21. Lacquaniti A., Donato V., Piantoni B. Normoalbuminuric diabetic nephropathy: tubular damage and NGAL. *Acta Diabetol.* 2013; 50(6): 935-42.
22. Garg V., Kumar M., Mahapatra H.S., Chitkara A., Gadpayle A.K., Sekhar V. Novel urinary biomarkers in prediabetic nephropathy. *Clin. Exp. Nephrol.* 2015; 19(5): 895-900.
23. Urazayeva L.I., Maksudova A.N. Biomarkers of early renal injury: review of literature. *Prakticheskaya meditsina.* 2014;1(4):125-30. (in Russian)
24. Petrica L., Vlad A., Gluhovschi G., Gadalean F., Dumitrascu V., Gluhovschi C. et al Proximal tubule dysfunction is associated with podocyte damage biomarkers nephrin and vascular endothelial growth factor in type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. *PLoS ONE.* 2014; 9(11): Article ID e112538.
25. de Carvalho A., Tatsch E., Hausen B.S. Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes. *Clin. Biochem.* 2016; 49(3): 232-36.
26. Fiseha T., Tamir Z. Urinary Markers of Tubular Injury in Early Diabetic Nephropathy. *Int. J. Nephrol.* Vol.2016;ArticleID4647685:10p ages ttp://dx.doi.org/10.1155/2016/4647685G.
27. Nikolov M., Boncheva, T. Gruev, S. Biljali, O. Stojceva Taneva, E. Masim-Spasovska Urinary biomarkers in the early diagnosis of renal damage in diabetes mellitus patients. *Scr. sci med.* 2013;45(3):58-64.
28. Petrica L., Vlad A., Gluhovschi G. Glycated peptides are associated with proximal tubule dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015;8(2): 2516-25.
29. Saif A., Soliman N. Urinary α 1-microglobulin and albumin excretion in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2016; 9(1):61-4. https://doi.org/10.1111/1753-0407.12383.
30. Novary E., Susanah S., Rachmadi D. The correlation of urine retinol binding protein-4 and serum HbA1c with glomerular filtration rate in type 1 (insulin-dependent) diabetic children: a perspective on the duration of diabetes. *Open Journal of Pediatrics.* 2015;5(2):134-40.
31. Tsai I.T., Wu C.C., Hung W.C., Lee T.L., Hsuan C.F., Wei C.T. et al. FABP1 and FABP2 as markers of diabetic nephropathy. *Int. J. Med. Sci.* 2020; 17(15): 2338-345. doi: 10.7150/ijms.49078.
32. Quiroga B., Arroyo D., de Arriba G. Present and future in the treatment of diabetic kidney disease. *J. Diabetes Res.* 2015; 2015, Article ID 801348: 13 pages.
33. Zhang D, Ye S, Pan T. The role of serum and urinary biomarkers in the diagnosis of early diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. 2019; *PeerJ.* 7:e7079. DOI 10.7717/peerj.7079.
34. Liu L., Guo Q., Li C., Dong W., Sun G. Novel Biomarkers for Early Diagnosis and Progression of Diabetic Nephropathy. *International Journal of Diabetes and Endocrinology (IJDE).* 2015;1(1):14-30.
35. Reda M., Amin H.K. Mini-review: clinical and molecular markers in early diabetic nephropathy. *MOJ Drug Des. Develop. Ther.* 2018;2(3):88-92. DOI: 10.15406/mojddt.2018.02.00034.
36. Mahendran K.B., Bhaskar M. V., Santha K., Inmozhi R., Perumal K.K. Plasma and Urinary Type IV Collagen Levels for Early Detection of Nephropathy in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *Int. J. Health Sci (Qassim).* 2016; 10(4): 492-8.
37. Miner, J.H. Type IV collagen and diabetic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 2020;16:3-4. https://doi.org/10.1038/s41581-019-0229-1.
38. Kishi F., Nagai K., Takamatsu N., Tominaga T., Tamaki M., Shibata E. et al. Urinary type IV collagen excretion is involved in the decline in estimated glomerular filtration rate in the Japanese general population without diabetes: A 5-year observational study. *PLoS ONE.* 2018; 13(4): e0195523. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195523.
39. Nielsen H.S., Rasmussen G.K. D., Brix S., Fenton A., Jesky M., Ferro C.J. et al. A novel biomarker of laminin turnover is associated with disease progression and mortality in chronic kidney disease. *PLoS ONE.* 2018; 13(10):e0204239. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204239.
40. Kopel J., Pena-Hernandez C., Nugent K. Evolving spectrum of diabetic nephropathy. *World J. Diabetes.* 2019; 10(5): 269-79.
41. Ullah N., Jing K., Xukun L., Li H., Lu W., Zhong Z. et al. Insights into predicting diabetic nephropathy using urinary biomarkers. *BBA – Proteins and Proteomics.* 2020; 1868(10): 140475. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140475.

BIOCHEMISTRY

42. N.Garcia-Fernandez, C. Jacobs-Cachá, J. M. Mora-Gutiérrez, A. Vergara, J. Orbe, M. J. Soler Matrix Metalloproteinases in Diabetic Kidney Disease. *J Clin Med.* 2020, 9, 472; doi:10.3390/jcm9020472.
43. O.Zakiyanov, M. Kalousová, T. Zima, V. Tesař MMP in Renal Diseases. *Kidney Blood Press Res.* 2019;44:298–330. DOI: 10.1159/000499876.
44. Donate-Correa J.J., Ferri C.M., Sánchez-Quintana F., Pérez-Castro A., González-Luis A., Martín-Núñez E. et al. Inflammatory Cytokines in Diabetic Kidney Disease: Pathophysiologic and Therapeutic Implications. *Front Med.* 2021; 7:628289. doi:10.3389/fmed.2020.628289.
45. Kutsenko L.V., Zorin I.V., Vyalkova A.A. Patogeneticheskie mekhanizmy formirovaniya nefropatii pri saharhom diabete 1 tipa. *Lechashchiy vrach.* 2018;6:58-61. (in Russian)
46. Rakityanskaya I.A., Ryabov S.I., Azanchevskaya S.V., Ryabova T.S., Popova V.B., Chernorutskaya E.I. et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Klinicheskaya bol'nitsa.* 2014;1(07): 20-5. (in Russian)
47. Pérez-Morales R.E., Dolores del Pinob M., Valdivielso J.M., Ortíz A., Mora-Fernández C., Navarro-González J.F. Inflammation in Diabetic Kidney Disease. *Nephron.* 2019;143:12–16 DOI: 10.1159/000493278.
48. Tam F.W.K., Ong A.C.M. Renal monocyte chemoattractant protein-1: an emerging universal biomarker and therapeutic target for kidney diseases? *Nephrol. Dial. Transplant.* 2020;35(2):198–203. https://doi.org/10.1093/ndt/gfz082.
49. Hojs N.V., Bevc S., Ekart R., Hojs R. Oxidative Stress Markers in Chronic Kidney Disease with Emphasis on Diabetic Nephropathy. *Antioxidants.* 2020;9(10):925; doi:10.3390/antiox9100925.
50. Popykhova E.B., Stepanova T.V., Lagutina D.D., Kiriazzi T.S., Ivanov A.N. The Role of Diabetes in the Onset and Development of Endothelial Dysfunction. *Problemy endokrinologii.* 2020;66(1):47-55. (in Russian)
51. Nickolsky Yu.Ye., Chekhonatskaya M.L., Zakharova N.B., Popykhova E.B., Ponukalin A.N. Magnetic resonance imaging and biomarkers of serum and urine wile diagnostics of kidney cancer. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal.* 2016; 12(1):52–6. (in Russian)
52. Rebrov A.P., Zakharova N.B., Popykhova E.B. Biomarkery vospaleniya i faktor rosta endoteliya sosudov (VEGF) kak faktory prognoza u bol'nyh rakom molochnoj zhelezy (RMZH). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2014; 59(9):39. (in Russian)
53. Pronina E.A., Maslyakov V.V., Stepanova T.V., Popykhova E.B., Ivanov A.N. Analysis of regeneration mechanisms in autotransplantation. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik imeni akademika I.P. Pavlova.* 2019; 27(3):393-406. (in Russian)
54. Popykhova E.B., Ivanov A.N., Stepanova T.V., Pronina E.A., Lagutina D.D. The relation of carbohydrate metabolism disorders and markers of endothelial dysfunction in animals with absolute insulin deficiency at biostimulation by autotransplantation of the skin flap. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal.* 2019;15 (2): 379–82. (in Russian)
55. Rysz J., Gluba-Brzózka A., Franczyk B., Jablonowski Z., Ciałkowska-Rysz A. Novel Biomarkers in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease and the Prediction of Its Outcome *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1702; doi:10.3390/ijms180817.
56. Kamysheva E.S., Bobkova I.N., Kutyrina I.M. New insights on microRNAs in diabetic nephropathy: potential biomarkers for diagnosis and therapeutic targets. *Sakharnyi diabet.* 2017;20(1):42-50. (in Russian)

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Тарлычева А.А., Маркова Ж.Г., Юрченко Д.А., Шилова Н.В.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ОБРАБОТКИ ПРЕПАРАТОВ ЭЯКУЛЯТА ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», 115522, г. Москва, Россия

Одной из причин спонтанного прерывания беременности, бесплодия, рождения детей с нарушениями и пороками развития являются хромосомные аномалии (ХА), а также спонтанные анеуплоидии в гаметах у фенотипически нормальных родителей. Зачастую супружеские пары с репродуктивными проблемами, а также супруги, один из которых является носителем ХА, прибегают к использованию программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) для преимплантационной оценки хромосомного статуса зигот. Зачастую для оценки уровня спонтанной анеуплоидии в рамках программ ВРТ проводят исследование родительских гамет. Как правило, наиболее доступным для анализа материалом являются клетки эякулята. Для исследования полученных из эякулята препаратов гамет мужчин, используют метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Однако такой FISH-анализ сопряжен с рядом ограничений и трудностей из-за особенностей строения головки сперматозоидов, а именно сверхконденсированного состояния хроматина хромосом. Для повышения качества анализа и эффективности гибридизации необходимо проводить предгибризационную обработку препаратов. С целью оптимизации протокола FISH были использованы пять различных протоколов предгибризационной обработки препаратов эякулята, полученного от девяти фенотипически нормальных мужчин. В результате проведенного сравнительного анализа эффективности гибридизации показано, что наиболее эффективным для последующего молекулярно-цитогенетического исследования является протокол с использованием трис(2-карбоксетил) фосфингидрохлорида (ТСЕП) в качестве деконденсирующего агента. Разработанный гибридный протокол, сочетающий протеолитическую предобработку, длительное инкубирование в растворе 2хSSC, ТСЕП и тепловую деконденсацию может быть использован в случаях, когда другие протоколы предгибризационной обработки препаратов эякулята не эффективны.

Ключевые слова: ТСЕП; DTT; FISH сперматозоидов; анеуплоидия.

Для цитирования: Тарлычева А.А., Маркова Ж.Г., Юрченко Д.А., Шилова Н.В. Оптимизация протокола обработки препаратов эякулята для последующего молекулярно-цитогенетического исследования. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (10): 603-609. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-603-609>

Для корреспонденции: Тарлычева Анастасия Александровна, мл. науч. сотр. лаб. цитогенетики; e-mail: atarlycheva@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Финансирование. Работа проведена в рамках темы НИР №115013070082 «Структурная организация генома при редких хромосомных аномалиях».

Поступила 10.06.2021

Принята к печати 20.07.2021

Tarlycheva A.A., Markova Zh.G., Yurchenko D.A., Shilova N.V.

OPTIMIZATION OF THE SPERM PROCESSING PROTOCOL FOR SUBSEQUENT MOLECULAR CYTOGENETIC STUDIES

Research Centre for Medical Genetics, 115522, Moscow, Russian Federation

One of the causes of spontaneous pregnancy termination, infertility, and birth of children with development delay and malformations are chromosomal abnormalities (CA) as well as spontaneous aneuploidies in gametes of phenotypically normal parents. Often couples with reproductive problems, as well as spouses one of whom is a carrier of CA, turn to the programs of assisted reproductive technologies (ART) for preimplantation evaluation of the zygote chromosomal status. As part of ART programs, parental gametes are examined to assess the level of spontaneous aneuploidy. As a rule, the most accessible material for analysis is the ejaculate. Fluorescent in situ hybridization (FISH) is used to examine male gametes obtained from the ejaculate. However, this FISH-analysis has a number of limitations and difficulties because of the peculiarities of the sperm head structure, namely the supercondensed state of chromosome chromatin. In order to optimize the FISH protocol, five different protocols were used for pre-hybridization processing of ejaculate samples obtained from nine phenotypically normal men. A comparative analysis of hybridization efficiency showed that the protocol using tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) as a decondensation agent was the most effective for subsequent molecular cytogenetic studies. The developed hybrid protocol combining proteolytic pretreatment, TCEP and thermal decondensation can be used when other protocols for pre-hybridization treatment of ejaculate preparations are not effective.

Key words: TCEP; DTT; sperm FISH; aneuploidy.

For citation: Tarlycheva A.A., Markova Zh.G., Yurchenko D.A., Shilova N.V. Optimization of the sperm processing protocol for subsequent molecular cytogenetic studies. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (10): 603-609 (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-603-609>

For correspondence: Tarlycheva Anastasiya Aleksandrovna, junior researcher of the Laboratory of Cytogenetics;
e-mail: atarlycheva@yandex.ru

Information about authors:

Tarlycheva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9560-0273>;
Markova Zh.G., <https://orcid.org/0000-0003-2941-2861>;
Yurchenko D.A., <https://orcid.org/0000-0002-5934-5551>;
Shilova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-0641-1084>.

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

Acknowledgment. The reported study was funded by research work №115013070082 “Structural organization of the genome with rare chromosomal abnormalities”

Received 10.06.2021
Accepted 20.07.2021

Введение. Нарушение фертильности является глобальной проблемой, которая затрагивает около 15% супружеских пар и, согласно статистике, примерно в 50% случаев причиной бесплодия является нарушение фертильности у мужчин [1-3]. Снижение мужской фертильности может быть результатом врожденных и приобретенных аномалий мочеполовой системы, инфекций, повышенной температуры мошонки, эндокринных нарушений, иммунологических и генетических факторов [1, 4]. Генетическими причинами бесплодия и репродуктивных проблем являются сбалансированные ХА, а также спонтанные анеуплоидии в гаметех, возникшие *de novo* [5, 6]. Анеуплоидии, т.е. нарушение числа отдельных хромосом в виде наличия дополнительной гомологичной хромосомы (трисомия) или отсутствия одной из гомологичных хромосом (моносомия), являются наиболее частыми ХА у доимплантационных эмбрионов [7, 8]. Основными механизмами формирования клеток с анеуплоидией является хромосомное нерасхождение или анафазное отставание хромосом в родителем мейозе [8 – 10]. Возникновение одной из этих ошибок в гаметах родителей может привести к формированию зиготы как с моносомией, так и с трисомией, что, в свою очередь, может привести к спонтанному прерыванию беременности или к рождению ребенка с хромосомной патологией. Вероятность возникновения гамет с хромосомным дисбалансом увеличивается также в случае родительского носительства сбалансированных ХА [11]. Кроме того, показано, что при носительстве ХА наблюдается так называемый межхромосомный эффект, т.е. повышенный уровень спонтанной анеуплоидии по хромосомам, не вовлеченным в ХА, что определяет важность и целесообразность проведения молекулярно-цитогенетического исследования гамет при использовании программ ВРТ у пациентов с бесплодием и/или репродуктивными проблемами [12, 13].

В 40-60% случаев снижения мужской фертильности единственным этиологическим фактором являются аномалии морфологии сперматозоидов и качество спермы: олигозооспермия, астенозооспермия и тератозооспермия. Обычно эти аномалии объединяются и описываются как ОАТ-синдром (олигоастенотератозооспермия). При этом известно, что у пациентов с нарушениями сперматогенеза достоверно значимо повышаются средние значения частоты анеуплоидии в сперматозоидах в сравнении с мужчинами с нормальными показателями спермограммы [14–16]. Так, например, у пациентов с олигозооспермией отмечается статистически значимое повышение доли клеток

с анеуплоидией по хромосоме 21, составляющей в среднем 1,3%, а также повышение уровня дисомии по половым хромосомам – в среднем 1,4% в сравнении с 0,8% и 0,6%, соответственно, у пациентов с нормоспермией [14].

Для оценки частоты возникновения аномальных клеток, как правило, используют метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) [17-19]. Это исследование показано мужчинам с носительством структурных хромосомных перестроек и мужчинам, у которых в браке регистрировались повторные случаи невынашивания беременности у супруги [1,20]. FISH-анализ позволяет получать не только достоверные значения частот встречаемости гамет с различными вариантами патологической мейотической сегрегации ХА, но и позволяет оценить уровень спонтанной анеуплоидии у носителя хромосомной перестройки. Применение этого молекулярно-цитогенетического метода исследования сделало возможным анализ большого количества клеток и проведение гибридизации на любых свежеприготовленных препаратах сперматозоидов. Однако, несмотря на перечисленные достоинства FISH-метода, были обнаружены и некоторые его ограничения. Так, на достоверность получаемых результатов анализа влияет степень эффективности гибридизации. Максимальная, близкая к 100%, эффективность гибридизации достигается при оптимальной подготовке препаратов сперматозоидов к проведению FISH, позволяющей ДНК-зонду комплементарно взаимодействовать с ДНК-мишенем. В течение сперматогенеза замещение гистонов протаминами приводит к сверхконденсации хроматина [21]. Хроматин сперматозоидов локализован в ядре, которое занимает большую часть головки, при этом он примерно в 10 раз превышает плотность хроматина соматических клеток, что может существенно повлиять на проведение FISH-исследования [22-25]. Качество анализа и эффективность гибридизации в труднопроницаемом, сверхплотно конденсированном хроматине головок сперматозоидов значительно повышается за счет обработки препарата эякулята различными реагентами, которые позволяют ремоделировать хроматин, обеспечивая возможность проникновения ДНК-зонда к ДНК-мишеню, сохраняя при этом важные морфологические особенности клеток. Ремоделирование ядер сперматозоидов подразумевает восстановление дисульфидных связей (S-S) и замещения протаминов гистонами [26, 27].

Широкое распространение получила предварительная обработка препаратов сперматозоидов с ис-

пользованием окислительно-восстановительного агента дитиотреитола (ДТТ), который восстанавливает дисульфидные связи в ядрах сперматозоидов, что приводит к искусственной деконденсации *in vitro* сперматозоидов млекопитающих [28-30]. Однако применение этого реагента в качестве деконденсанта хроматина сопряжено с определенными трудностями и ограничениями. Оптимизация протокола деконденсации хроматина сперматозоидов является первоочередной задачей в исследовании мейотической сегрегации хромосом в сперматогенезе.

Материал и методы. Было проведено молекулярно-цитогенетическое исследование препаратов из эякулята 9 фенотипически нормальных мужчин. FISH проводили с использованием оксус-специфичных ДНК зондов на хромосомы 13 и 21 – PN 13(13q14) / 21(21q22), меченых флуорохромами SpectrumGreen и SpectrumOrange, соответственно, по протоколу производителя (Kreatech, Нидерланды). В каждом случае было проанализировано не менее 3000 клеток. Анализ осуществляли на эпифлуоресцентном микроскопе «AxioImager M.1» (CarlZeiss, Германия) с соответствующим набором светофильтров и использованием компьютерной программы обработки цифровых изображений «Isis» (MetaSystems, Германия). Полученные данные обрабатывали в программе Excel из пакета программ Microsoft Office 2007.

С целью разработки оптимального протокола для последующего исследования мейотической сегрегации сперматозоидов, был проведен сравнительный анализ препаратов из эякулята без деконденсации хроматина сперматозоидов, с тепловой деконденсацией хроматина, деконденсированных препаратов с использованием дитиотреитола (ДТТ) и деконденсированных препаратов с использованием трис(2-карбокситетил)фосфингидрохлорида (tris(2-carboxyethyl)phosphine – TCEP), а также препаратов, деконденсированных по гибриднему протоколу, разработанному в нашей лаборатории для работы с образцами с низкой эффективностью гибридизации при использовании других протоколов деконденсации хроматина сперматозоидов.

Методика приготовления препаратов из эякулята для FISH-анализа. Образец эякулята инкубировали при 37°C в течение 30 мин с последующим разведением в натрий-фосфатном буфере (phosphate buffered saline – PBS) в соотношении 1:9. Центрифугировали 7 мин при 1850g. Элиминировали надосадочную жидкость, добавляли охлажденный фиксатор Карнуа (метанол/ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1). Зафиксированную взвесь помещали на 60 мин на -20°C. Фиксатор меняли дважды, суспензию раскапывали на охлажденные влажные стекла.

Протоколы молекулярно-цитогенетического исследования

Протокол тепловой деконденсации хроматина сперматозоидов. Тепловую деконденсацию проводили в соответствии с ранее описанным протоколом [31]. На препаратах эякулята, приготовленных для FISH, денатурацию проводили при +90°C 10 минут, последующую гибридизацию в течение ночи проводили при +42°C.

Протокол деконденсации хроматина сперматозоидов с использованием ДТТ. Препараты, приготовленные для FISH, помещали в 5 мМ раствор ДТТ (Helicon) в 0.1M Tris и 1% Triton-X на 5-7 мин при +37°C, после

чего промывали в растворе 2xSSC 3 мин и дегидратировали в серии спиртов возрастающей концентрации по 1 минуте. Наносили на стекло 3,7% раствор формальдегида в PBS на 10 мин, промывали в растворе PBS 3 мин и дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации по 1 минуте.

Денатурацию проводили при 77°C, 7 мин с последующей гибридизацией в течение ночи при +37°C.

Протокол деконденсации хроматина сперматозоидов с использованием раствора TCEP. Препараты, приготовленные для FISH, помещали в раствор 2xSSC на 10-20 мин, на стекло наносили 13 мМ раствор TCEP (Applichem) на 3 мин, промывали в растворе 2xSSC 5 мин, наносили на стекло раствор 1% формалина в PBS на 3,5 минут. Препараты инкубировали в растворе 2xSSC 5 мин, после чего дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации по 1 минуте и сушили на воздухе.

Денатурацию проводили при 77°C, 7 мин с последующей гибридизацией в течение ночи при +37°C.

Гибридный протокол деконденсации хроматина сперматозоидов с использованием раствора пепсина и TCEP. Препараты помещали в 4% формальдегиде 10 минут, после чего отмывали в PBS дважды по 5 минут. Подготовленные таким образом препараты инкубировали в 0,3% растворе пепсина в течение 20 мин при 37°C, после чего отмывали в PBS дважды по 5 мин, дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации по 1 мин и сушили на воздухе. Затем препараты инкубировали в растворе 2xSSC в течение 20 мин при +37°C, после чего на стекло наносили 13 мМ раствор TCEP на 3 мин, промывали в 2xSSC 5 мин, наносили на стекло 1% раствор формалина в PBS на 3,5 минут. Препараты инкубировали в растворе 2xSSC в течение 5 мин, после чего дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации по 1 мин и сушили на воздухе.

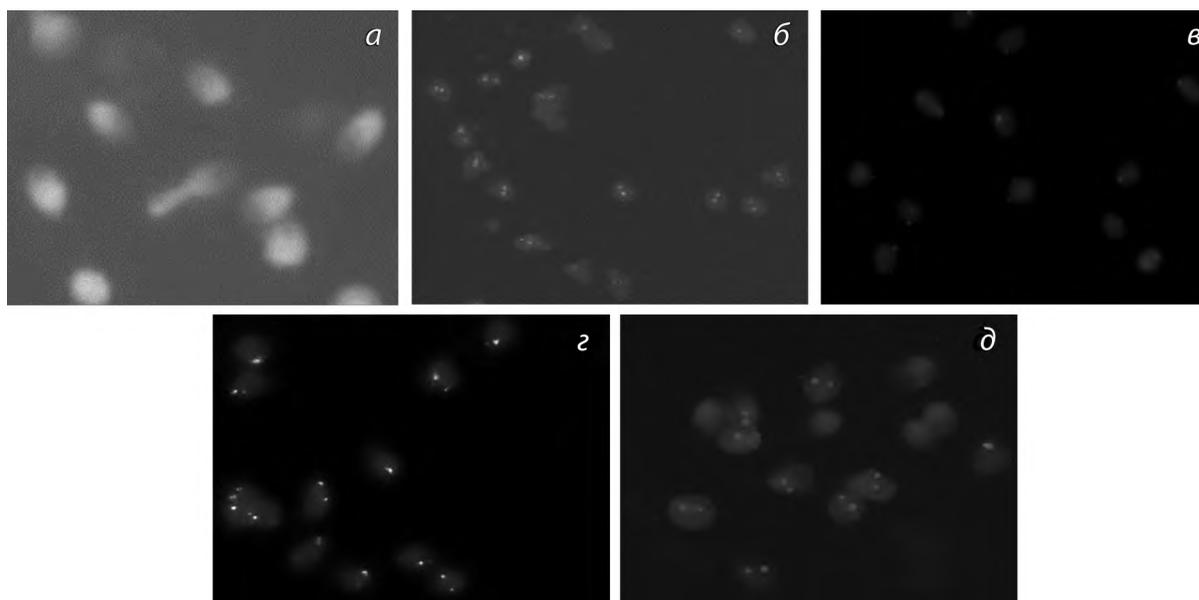
Денатурацию проводили при +90°C, 10 мин с последующей гибридизацией в течение ночи при +42°C.

Результаты. Был проведен FISH-анализ препаратов эякулята, полученного от 9 фенотипически нормальных мужчин, и подготовленных для FISH с использованием различных протоколов предобработки. Для выявления оптимального протокола использовали такие критерии как оценка эффективности гибридизации с локус-специфическими ДНК-зондами на хромосомы 13 и 21, т.е. определение частоты клеток с гибридизационными сигналами, а также соотношение «шум/сигнал», который определяли как отношение фоновой гибридизации к интенсивности гибридизационного сигнала.

Результаты сравнительной оценки различных протоколов предобработки клеток эякулята представлены в табл. 1 и на рисунке. Всего было проанализировано 79 488 клеток.

Обсуждение. Эффективность гибридизации, т.е., процент клеток с гибридизационными сигналами, на препаратах эякулята без деконденсации была самой низкой и в среднем составляла 23%. Фоновая гибридизация («шум») была высокой, а обнаруженные сигналы слабые (см. рисунок, а). Низкая эффективность гибридизации, преобладание фоновой гибридизации не позволили ни в одном случае провести корректный подсчет гибридизационных сигналов.

В препаратах, которые были подвергнуты тепловой деконденсации, эффективность гибридизации ва-



Результаты проведения молекулярно-цитогенетического исследования FISH с локус-специфичными ДНК-зондами на хромосомы 13 и 21. *а* – без обработки; *б* – тепловая обработка; *в* – протокол с использованием ДТТ; *г* – протокол с использованием ТСЕР; *д* – гибридный протокол.

Таблица 1

Эффективность гибридизации в клетках эякулята при использовании различных протоколов деконденсации хроматина ядра сперматозоидов

Показатели	Эффективность гибридизации (%) ±SD	«Шум»/сигнал	Всего проанализировано клеток
Без деконденсации	23,1±2,2	+/-	18751
Тепловая обработка	78,8±8,2	+/+	13246
ДТТ	73,8±1,2	-/+	16346
ТСЕР	93,4±1,5	-/+	15467
Гибридный протокол	67,8±9,7	+/+	15678

Примечание. ±SD – стандартное отклонение; + - наличие шума/сигнала; — - отсутствие шума/сигнала.

рьировала от 70 до 90%, составляя в среднем 78,8%. Такая обработка позволяет полностью сохранить морфологические особенности сперматозоидов и отличается быстротой выполнения процедуры. Однако данный протокол чувствителен как к качеству фиксации эякулята (недостаточное время фиксации, недостаточно низкая температура фиксатора, много белковой составляющей во взвеси), так и к качеству используемых предметных и покровных стёкол, что затрудняет воспроизводимость методики. Высокая интенсивность фоновой гибридизации, нестабильность тепловой обработки в целом определяют целесообразность использования тепловой деконденсации хроматина только в случаях, когда при анализе необходимо полностью сохранить морфологию сперматозоидов (см. рисунок, б).

Эффективность гибридизации в клетках, которые были деконденсированы с использованием ДТТ варьировала от 70 до 98%, составляя в среднем 73,8%. Наличие ярких дискретных гибридизационных сигналов обеспечило возможность корректного подсчета

количества гибридизационных сигналов как для хромосомы 13, так и для хромосомы 21 (см.рисунок, в). Протокол с использованием ДТТ в качестве деконденсирующего агента является стандартным и общепринятым для обработки препаратов сперматозоидов [15, 31, 32]. Однако работа с раствором ДТТ должна проводиться с тщательным соблюдением условий личной безопасности, поскольку этот реагент является крайне летучим и токсичным веществом. Готовый раствор нестабилен, приготавливается *ex tempore* и требует замены не позднее, чем через три часа после приготовления рабочего раствора. Использование в рабочем протоколе дитиотреитола требует наличия вытяжного шкафа и термостата или водяной бани, а также контроля кислотности раствора, поскольку оптимальный рН для дитиотреитола составляет 7,1-8,0. Существенным недостатком является то, что в результате обработки ДТТ клетки могут изменить свою морфологию. Для анализа сегрегации хромосом более значимым является высокая эффективность гибридизации (ниже 85%) и низкий уровень фоновой гибридизации, одна-

Сравнительная оценка различных протоколов деконденсации сперматозоидов человека.

Показатели	Преимущества протокола	Недостатки протокола
Без деконденсации	-	Низкое качество сигналов Низкая эффективность гибридизации Фоновая гибридизация
Тепловая деконденсация	Простота выполнения Скорость выполнения Сохранность морфологии клеток	Невысокая эффективность гибридизации Чувствительность к качеству используемых материалов Фоновая гибридизация
ДТТ	Дискретность гибридизационных сигналов Отсутствие фоновой гибридизации	Невысокая эффективность гибридизации Токсичность реактива Узкий диапазон рабочего pH=7.1-8.0 Необходимость изготовления <i>ex tempore</i> Нарушение морфологии клеток
ТСЕР	Высокая эффективность гибридизации Отсутствие фоновой гибридизации Широкий диапазон рабочего pH=1.5-9.0 Высокое качество сигналов Возможность долгого хранения рабочего раствора при температуре -20°C	Не отмечено
Гибридный протокол	Позволяет провести анализ в случаях, когда ни один другой протокол не эффективен	Фоновая гибридизация Длительность выполнения Нарушение морфологии клеток

ко при проведении исследований, требующих сохранности морфологии клеток, более предпочтительным протоколом предобработки может являться тепловая деконденсация с хотя и более высокой фоновой гибридизацией, но меньшими изменениями клеточной морфологии [28].

Самая высокая эффективность гибридизации была отмечена в препаратах сперматозоидов, которые были деконденсированы с использованием ТСЕР, где она в среднем составила 93,4% с диапазоном от 89,5 до 98% при практическом отсутствии фоновой гибридизации (см. рисунок, з). Достоинствами данного протокола является техническая простота его применения, возможность хранения готового раствора в течение длительного времени при температуре -20°C с сохранением стабильности. Показано, что ТСЕР эффективно восстанавливает дисульфидные связи в широком диапазоне pH (1,5-8,5) [33,34]. Единственным условным недостатком данного протокола является более высокая, в 2 раза выше, стоимость трис (2-карбоксиэтил) фосфингидрохлорида в сравнении дитиотреитолом [30].

В одном из девяти случаев эффективность гибридизации не превысила 5% при использовании протоколов, описанных выше. С целью повышения эффективности гибридизации, нами был разработан гибридный протокол денатурации хроматина сперматозоидов, сочетающий протеолитическую обработку с использованием раствора пепсина, отмывку в растворе 2xSSC и последующую деконденсацию с ТСЕР. При эффективности гибридизации в клетках препаратов при использовании гибридного протокола варьировала от 50 до 70% и в среднем составляла 67,8%. Следует отметить, что использование пепсина в качестве протеолитического агента позволило несколько улучшить соотношение «шум»/сигнал, однако привело к изменению морфологии сперматозоидов (см. рисунок, д).

Тем не менее несмотря на то, что это самый длительный по времени выполнения протокол из всех представленных с низкой эффективностью гибридизации и возможным нарушением морфологии клеток, его использование позволяет провести анализ даже в тех случаях, когда эффективность гибридизации составляет менее 5%. Таким образом, гибридный протокол может стать единственным, благодаря которому возможно провести анализ без необходимости повторного сбора материала.

Таким образом, эффективность гибридизации при использовании протокола с ТСЕР статистически значимо ($p < 0,05$) превышала таковую при всех прочих протоколах деконденсации хроматина, что позволяет считать ТСЕР оптимальным для ремоделирования хроматина ядер сперматозоидов в целях дальнейшего молекулярно-цитогенетического исследования мужских гамет.

В табл. 2 суммированы преимущества и недостатки всех рассмотренных протоколов деконденсации хроматина сперматозоидов.

Заключение. С развитием молекулярно-цитогенетических методов исследования, таких как флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), стало возможным исследовать мейотическую сегрегацию хромосом в препаратах эякулята. Однако, в отличие от диффузного хроматина соматических клеток, особенности конденсации хроматина в сперматозоидах требуют оптимизации протоколов пробоподготовки к проведению FISH. Общепринятым и широко используемым в различных лабораториях деконденсирующим реагентом является дитиотреитол (ДТТ). Учитывая вышеописанные негативные свойства ДТТ, в целях оптимизации протокола пробоподготовки препаратов сперматозоидов человека для FISH-исследования мы использовали деконденсирующий реагент трис(2-карбоксиэтил)фосфингидрохлорид (ТСЕР). При применении такого протокола

CYTOLOGY

деконденсации хроматина сперматозоидов была отмечена максимальная эффективность гибридизации при наибольшей сохранности морфологии сперматозоидов и оптимальном соотношении «шум»/сигнал. Предложенный гибридный протокол предгибридизационной подготовки сперматозоидов, сочетающий деконденсацию хроматина с его протеолизом, позволяет проводить FISH-анализ в тех случаях, когда клетки эякулята нечувствительны к более щадящим протоколам деконденсации.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-7, 9-13, 15-22, 26-35
см. REFERENCES)

8. Лебедев И.Н., Никитина Т.В. На пути от цитогенетики к цитогеномике ранних репродуктивных потерь. *Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике*. Новосибирск, 2014; 21: 3-84.

14. Тарлычева А.А., Маркова Ж.Г., Сорокина Т.М., Черных В.Б., Шилова Н.В. Частота анеуплоидии в сперматозоидах у мужчин с нарушением фертильности. *Медицинская генетика*. 2020; 19(3): 89-90. doi:10.25557/2073-7998.2020.03.89-90.

23. Брагина Е.Е., Арифалин Е.А., Лазарева Е.М., Лелекова М.А., Коломиец О.Л., Чоговадзе А.Г. и др. Нарушение конденсации хроматина сперматозоидов и фрагментация днк сперматозоидов: есть ли корреляция? *Андрология и генитальная хирургия*. 2017; 18(1): 48-61. doi:10.17650/2070-9781-2017-18-1-48-61.

24. Арифалин Е.А., Брагина Е.Е., Замятнина В.А., Волкова Е.Г., Шеваль Е.В., Голышев С.А. и др. Компактизация ДНК в сперматогенезе человека. I. Динамика компактизации нуклеогистонного и нуклеопротаминного хроматина в дифференцирующихся сперматидях. *Онтогенез*. 2012; 43(2): 143-53.

25. Брагина Е.Е., Замятнина В.А., Боcharова Е.Н., Шилейко Л.В., Курило Л.Ф., Гусак Ю.К. Количественное ультраструктурное исследование хроматина сперматозоидов при нарушении фертильности. *Андрология и генитальная хирургия*. 2009; 1: 44-9. doi:10.17650/2070-9781-2014-1-41-50.

REFERENCES

1. Dohle G.R., Colpi G.M., Hargreave T.B., Papp G.K., Jungwirth A., Weidner W. EAU guidelines on male infertility. *Eur. Urol.* 2015; 48(5): 703-11. doi:10.1016/j.eururo.2005.06.002.

2. Anton E., Vidal F., Blanco J. Role of sperm FISH studies in the genetic reproductive advice of structural reorganization carriers. *Human Reproduction*. 2007; 22(8): 2088-92. Doi:10.1093/humrep/dem152.

3. Borght M.V., Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry*. 2018; 62:2-10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.

4. Rowe P.J., Comhaire F.H., Hargreave T.B., Mellows H.J. WHO manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple. *Cambridge University Press*; 1993.

5. Mau-Holzmann U.A. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet. Genome Res.* 2005; 111:317-336. doi:10.1159/000086906.

6. Donker R.B., Vloeberghs V., Groen H., Tournaye H., C.M.A. van Ravenswaaij-Arts, Land J.A. Chromosomal abnormalities in 1663 infertile men with azoospermia: the clinical consequences. *Human Reproduction*. 2017; 32(12): 2574-80. doi:10.1093/humrep/dex307.

7. Hassold T., Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001; 2:280-291. doi:10.1038/35066065.

8. Lebedev I.N., Nikitina T.V. On the way from cytogenetics to cytogenomics of early reproductive loss. *Molecular biological tech-*

nologies in medical practice [*Molekulyarno-biologicheskie tekhnologii v meditsinskoy praktike*]. Novosibirsk. 2014; 21: 3-84. (in Russian)

9. García-Mengual E. Triviño, Sáez-Cuevas J.C., Bataller A., Ruiz-Jorro J., M. Vendrell X. Male infertility: establishing sperm aneuploidy thresholds in the laboratory. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2019; 36: 371-81. doi:10.1007/s10815-018-1385-0.

10. Sarrate Z., Vidal F., Blanco J. Role of sperm fluorescent in situ hybridization studies in infertile patients: indications, study approach, and clinical relevance. *Fertil Steril.* 2010; 93(6):1892-1902. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.12.139.

11. Balasar Ö., Acar H. Investigation of the interchromosomal effects in male carriers with structural chromosomal abnormalities using FISH. *Turk J. Urol.* 2020; 46(3): 178-85. doi:10.5152/tud.2020.19255.

12. Anton E., Vidal F., Blanco J. Reciprocal translocations: tracing their meiotic behavior. *Genet Med.* 2008; 10: 730-8. doi:10.1097/GIM.0b013e318187760f.

13. Shi Q., Martin R.H. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction*. 2001; 121(5): 655-66. doi:10.1530/rep.0.1210655.

14. Tarlycheva A.A., Markova Zh.G., Sorokina T.M., Chernyh V.B., Shilova N.V. The frequency of aneuploidy in sperm in men with impaired fertility. *Meditsinskaya genetika*. 2020; 19(3): 89-90. doi:10.25557/2073-7998.2020.03.89-90. (in Russian)

15. Calogero A.E., Burrello N., A De Palma, Barone N, D'Agata R., Vicari E. et al. Sperm aneuploidy in infertile men. *Reproductive BioMedicine Online*. 2003; 6(3): 310-7. doi:10.1016/S1472-6483(10)61850-0.

16. Webster A., Schuh M. Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends in Cell Biology*. 2017; 27(1):55-68. doi:10.1016/j.tcb.2016.09.002.

17. Fakhrabadi M.P., Kalantar S.M., Montazeri F., Ashkezari M.D., Fakhrabadi M.P., Nejad Yazd S.S. FISH-based sperm aneuploidy screening in male partner of women with a history of recurrent pregnancy loss. *Middle East Fertil Soc J.* 2020; 25:23. doi:10.1186/s43043-020-00031-6.

18. Calogero A.E., De Palma A., Grazioso C., Barone N., Romeo R., Rappazzo G., Rosario D'Agata R. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Human Reproduction*. 2001; 16(6): 1172-9.

19. Chatziparasidou A., Christoforidis N., Samolada G., Nijs M. Sperm aneuploidy in infertile male patients: a systematic review of the literature. *Andrologia*. 2015; 47(8): 847-60. doi:10.1111/and.12362.

20. Racovita S., Mosin V., Capcelea S., Misina A., Sprincean M. Chromosomal abnormalities in men with azoospermia. *The Moldovan Medical Journal*. 2021; 64(1): 50-5. doi:10.5281/zenodo.4527139.

21. Agarwal A., Said T. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum. Reprod. Update*. 2003; 9: 331-45. doi:10.1093/humupd/dmg027.

22. Braun R.E. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature Genetics*. 2001; 28:10-2. doi:10.1038/ng0501-10.

23. Bragina E.E., Arifulin E.A., Lazareva E.M., Lelakova M.A., Kolomiec O.L., Chogovadze A.G. et al. Abnormal chromatin condensation in spermatozoa and DNA fragmentation in spermatozoa: Is there a correlation? *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*. 2017; 18(1): 48-61. doi:10.17650/2070-9781-2017-18-1-48-61. (in Russian)

24. Arifulin E.A., Bragina E.E., Zamiatnina V.A., Volkova E.G., Sheval' E.V., Golyshev S.A. et al. Chromatin Folding in Human Spermatozoa. I. Dynamics of Chromatin. Remodelling in Differentiating Human Spermatids *Ontogenез*. 2012; 43(2): 143-53. (in Russian)

25. Bragina E.E., Zamyatnina V.A., Bocharova E.N., Shileyko L.V., Kurilo L.F., Gusak Yu.K. Quantitative electron microscopic examination of sperm for male infertility diagnosis. *Andrologiya i*

- genital'naya khirurgiya*. 2009; 1: 44–9. doi: 10.17650/2070-9781-2014-1-41-50 (in Russian)
26. Zirkin B.R., Perreault S.D., Naish S.J. Formation and function of the male pronucleus during mammalian fertilization. *The Molecular Biology of Fertilization*. 1989; 91–114.
 27. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. 1994; 189–317.
 28. Seligman J., Kosower N.S., Weissenberg R., Shalgi R. Thioldisulfide status of human sperm proteins. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1994; 101: 435–43.
 29. Motoishi M., Goto K., Tomita K., Ookutsu S., Nakanishi Y. Decondensation of bull and human sperm nuclei by dithiothreitol and/or heparin. *Journal of Reproduction and Development*. 1996; 42: 7–13.
 30. Galli C., Vassilive I., Lagutina I., Galli A., Lazzari G. Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. *Theriogenology*. 2003; 60: 1467–80.
 31. Santos T.A., Dias C., Brito R., Santos A.A. Analysis of Human Spermatozoa by Fluorescence In Situ Hybridization with Preservation of the Head Morphology Is Possible by Avoiding a Decondensation Treatment. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2002; 19: 291–4. doi:10.1023/A:1015781330919.
 32. Arumugam M., Shetty D.P., Kadandale J.S., Nmilu S.K. Association of Sperm Aneuploidy Frequency and DNA Fragmentation Index in Infertile Men. *J. Reprod. In-fertil.* 2019; 20(3): 121–6.
 33. Han J.C., Han G.Y. A procedure for quantitative determination of Tris(2-Carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Anal. Biochem.* 1994; 220(1): 5–10. doi:10.1006/abio.1994.1290.
 34. Roszkowski M., Mansuy I.M. High Efficiency RNA Extraction From Sperm Cells Using Guanidinium Thiocyanate Supplemented With Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; 9: 648274. doi:10.3389/fcell.2021.648274.
 35. Santarino I., Oliveira S.C.B., Oliveira-Brett A. Protein reducing agents dithiothreitol and tris(2-carboxyethyl)phosphine anodic oxidation. *Electrochemistry Communications*. 2012; 23: 114–7. doi:10.1016/j.elecom.2012.06.027.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Карзакова Л.М., Кудряшов С.И., Борисова Л.В., Журавлева Н.В., Комелягина Н.А., Одинцова А.В., Сидоров И.А.

ОСОБЕННОСТИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ КРОВИ И МОЧИ У БОЛЬНЫХ ПОСТИНФЕКЦИОННЫМ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», 428015, Чебоксары, Россия

Своевременность диагностики и лечения постинфекционного гломерулонефрита (ПИГН) в настоящее время ограничивают стертость, малосимптомность заболевания, что побуждает к поиску информативных биологических маркеров заболевания, в роли которых могут выступать иммунологические показатели крови и мочи. Исследование проведено с целью установления характерных изменений в иммунологических показателях крови и мочи у больных ПИГН. В исследовании включено 60 пациентов с ПИГН из числа больных, госпитализированных в нефрологическое отделение Республиканской клинической больницы Министерства здравоохранения Чувашской Республики в 2015-2018 гг. Помимо общепринятых методов исследования больным проводили: 1) определение показателей врожденного и приобретенного иммунного ответа в крови ($CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD4^+CD25^+$, $CD95^+$, $CD20^+$, $CD14^+CD282^+$, $CD14^+CD284^+$ – клетки; уровни IgG, IgA, IgM, циркулирующих иммунных комплексов, C3, C4) и мочи (уровни IgG, IgA, IgM, C3, C4); 2) определение уровней цитокинов – IL-1 β , Ra-IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A в сыворотке крови и моче. Полученные данные сравнивали с таковыми у группы здоровых лиц. Изменения иммунологических показателей крови, выявленные в группе пациентов с ПИГН, свидетельствуют об активации врожденного иммунитета (увеличение числа $CD14^+TLR2^+$ -клеток) и гуморального звена адаптивного иммунитета (увеличение числа В-лимфоцитов, гипериммуноглобулинемия – повышение уровней IgM и IgA) на фоне уменьшения числа Т ($CD3^+$)-лимфоцитов и регуляторных ($CD4^+CD25^{high}$) – клеток, гипокмplementемии (снижение уровней C3, C4). В моче обнаружено повышение содержания C3, IgG и IgA. Для цитокинового профиля крови у больных ПИГН было характерно повышение уровней про- и противовоспалительных цитокинов IL-1 β , Ra-IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-10, IL-17A, за исключением IL-4, сохранявшегося на уровнях здоровых лиц. Цитокиновый профиль мочи у больных отличался повышением уровней провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-17A и противовоспалительного цитокина – IL-10 при отсутствии изменений в содержании Ra-IL-1 β и IL-4. Обнаруженные особенности иммунологического профиля крови и мочи у больных ПИГН отражают иммунопатогенетические механизмы данного заболевания.

Ключевые слова: врожденный иммунитет; адаптивный иммунитет; цитокины; постинфекционный гломерулонефрит.

Для цитирования: Карзакова Л.М., Кудряшов С.И., Борисова Л.В., Журавлева Н.В., Комелягина Н.А., Одинцова А.В., Сидоров И.А. Особенности иммунологического профиля крови и мочи у больных постинфекционным гломерулонефритом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (10): 610-617. <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-610-617>

Для корреспонденции: Карзакова Луиза Михайловна, д-р мед. наук, зав. каф. внутренних болезней с курсом клинической иммунологии; e-mail: luizak58@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 25.11.2020

Принята к печати 20.05.2021

Karzakova L.M., Kudryashov S.I., Borisova L.V., Zhuravleva N.V., Komelyagina N.A., Odintsova A.V., Sidorov I.A.

FEATURES OF THE IMMUNOLOGICAL PROFILE OF BLOOD AND URINE IN PATIENTS WITH POST-INFECTIOUS GLOMERULONEPHRITIS

The Ulyanov Chuvash State University, Russia, 428015, Cheboksary

The timely diagnosis and treatment of post-infectious glomerulonephritis (PIGN) is currently limited by the erased and low-symptom nature of the disease, which leads to the search for informative biological markers of the disease, which can be used as immunological indicators of blood and urine. The study was carried out in order to establish the characteristic changes in the immunological parameters of blood and urine in patients with PIGN. The study included 60 patients with PIGN from among the patients, hospitalized in the nephrology department of the Republican Clinical Hospital of Health Care Ministry of the Chuvash Republic in 2015-2018. In addition to the generally accepted research methods, the patients underwent: 1) the determination of indicators of innate and acquired immune response in the blood ($CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD4^+CD25^+$, $CD95^+$, $CD20^+$, $CD14^+CD282^+$, $CD14^+CD284^+$ - cells; levels of IgG, IgA, IgM, circulating immune complexes, C3, C4) and urine (levels of IgG, IgA, IgM, C3, C4); 2) the determination of the levels of cytokines - IL-1 β , Ra-IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A in blood serum and urine. The data obtained were compared with those of the group of healthy individuals. The changes in blood immunological parameters, identified in the group of patients with PIGN, indicate the activation of innate immunity (the increase in the number of $CD14^+TLR2^+$ - cells) and the humoral component of adaptive immunity (the increase in the number of B-lymphocytes, hyperimmunoglobulinemia - the increase in IgM and IgA levels) against the background of the decrease in the number of T ($CD3^+$) - lymphocytes and regulatory ($CD4^+CD25^{high}$) - cells, hypocomplementemia (decreased levels of C3, C4). The increase in the content of C3, IgG and IgA was found in the urine. The cytokine profile of blood in patients with PIGN was characterized by the increase in the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines IL-1 β , Ra-IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-10, IL-17A,

with the exception of IL-4, which remained on the levels of healthy individuals. The cytokine profile of urine in patients was characterized by the increase in the levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-17A and anti-inflammatory cytokine - IL-10, with no changes in the content of Ra-IL-1 β and IL-4. The revealed features of the immunological profile of blood and urine in patients with PIGN reflect the immunopathogenetic mechanisms of this disease.

Key words: innate immunity; adaptive immunity; cytokines; post-infectious glomerulonephritis.

For citation: Karzakova L.M., S. Kudryashov S.I., Borisova L.V., Zhuravleva N.V., Komelyagina N.A., Odintsova A.V., Sidorov I.A. Features of the immunological profile of blood and urine in patients with post-infectious glomerulonephritis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (10): 610-617 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-610-617>

For correspondence: Karzakova L.M., Dr. Sci. Med., Head of the department of internal diseases «Chuvashskii state university»; e-mail: luizak58@mail.ru

Information about authors:

Karzakova L.M., <http://orcid.org/0000-0002-5899-6352>;
Kudryashov S.I., <http://orcid.org/0000-0003-2277-9425>;
Borisova L.V., <https://orcid.org/0000-0002-1245-3811>;
Zhuravleva N.V., <http://orcid.org/0000-0001-6470-7724>;
Komelyagina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-4155-4849>;
Odintsova A.V., <https://orcid.org/0000-0001-7069-5029>;
Sidorov I. A., <https://orcid.org/0000-0003-3658-6579>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 25.11.2020

Accepted 20.05.2021

Введение. Одной из важных проблем современной медицины является задача сокращения числа больных хронической болезнью почек (ХБП), вызывающей развитие терминальной почечной недостаточности (ТПН), на лечение которой расходуются во всем мире колоссальные средства [1]. В РФ главной причиной развития ТПН являются гломерулонефриты (ГН) – группа заболеваний, в основе которых лежит иммуновоспалительное поражение почечных гломерул. Родоначальником гломерулопатий является Брайтова болезнь – постстрептококковый гломерулонефрит (ПСГН), связанный с перенесенной стрептококковой инфекцией. Коренные сдвиги в эпидемиологии ПСГН произошли около три десятка лет назад. Заболеваемость ПСГН резко снизилась в промышленно развитых странах благодаря эффективной антибиотикотерапии стрептококковых инфекций и улучшению санитарных условий, однако ПСГН продолжает быть распространенным заболеванием в развивающихся странах [2]. Изменилась этиологическая структура ГН, связанных с инфекцией. Стафилококки (в частности, *Staphylococcus aureus*) и вирусы стали наиболее часто встречающимися причинными факторами ПИГН. С учетом этого, гломерулопатии, развитие которых связано с инфекцией, стали именовать «постинфекционными гломерулонефритами» (ПИГН) [3]. Своевременность диагностики и лечения ПИГН в настоящее время ограничивают стертость и малосимптомность заболевания, что побуждает к поиску информативных биологических маркеров заболевания, в роли которых могут выступать иммунологические показатели крови и мочи. Ранее предпринимались исследования по изучению отдельных компонентов иммунного статуса у пациентов с ПИГН [4], однако до сих пор нет полного представления о характере изменений в иммунологических показателях крови и мочи у больных ПИГН. В связи с приведенным целью исследования явилось установление характерных изменений в иммунологических показателях крови и мочи у больных ПИГН.

Материал и методы. В обсервационное, одноцентровое, одномоментное исследование отбирали пациентов ПИГН, получающих стационарное лечение в нефрологическом отделении БУ «Республиканская клиническая больница» Минздрава Чувашской Республики (в 2015-2018 гг.). Перед началом исследования получали от больных и здоровых лиц добровольное информированное согласие на исследование в письменной форме. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом при ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» (протокол заседания №3/2 от 30.11.2015).

В исследование включали больных обоих полов, в возрасте от 18 до 65 лет с подтвержденным диагнозом ПИГН. Критериями включения служили: 1) установленный диагноз ГН, развившегося после перенесенной инфекции (острое респираторное заболевание, инфекции рото-, носоглотки, кожи, урогенитальная инфекция и др.) или в период манифестации данных инфекционных заболеваний; 2) дебют ПИГН. ПИГН диагностировали при выявлении трех из следующих признаков: 1) клинические или лабораторные признаки предшествующей развитию ГН инфекции или наличие инфекции в период развития ГН, 2) диффузный эндокапиллярный пролиферативный/экссудативный ГН, 2) снижение содержания в сыворотке крови компонентов комплемента – С3 и/или С4, 3) отложение в почечных клубочках С3 в сочетании с иммунными комплексами или без них, 4) обнаружение при электронной микроскопии горбикоподобных субэпителиальных образований на месте депозитов иммунных комплексов [5]. При отборе больных исключали из исследования лиц, имеющих сопутствующие заболевания (желудочно-кишечные, сердечно-сосудистые); вторичные ГН в рамках системных аутоиммунных заболеваний; почечную недостаточность (креатинин сыворотки крови выше 200 мкг/л, скорость клубочковой фильтрации – СКФ ниже 60 мл/мин); возраст больше 65 лет; беременность. В контрольную группу включали практически здоровых лиц обоего пола от 18 до 65

лет, с нормальными показателями функционального состояния почек и артериального давления, у которых отсутствовали хронические заболевания и указания на острые заболевания в течение последнего месяца.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли на градиенте плотности фиколла-верографина ($\rho=1,077$ г/см³). Для идентификации лимфоцитов и их субпопуляций проводили иммунофенотипирование МНК методом прямой иммунофлюоресценции на проточном цитофлуориметре Fc500 («BeckmanCoulter», США). При этом использовали моноклональные антитела (МКАТ) к дифференцировочным маркерам CD3, CD3/CD4, CD3/CD8, CD20, CD4/CD25, CD95 (Beckman Coulter) согласно методике производителя МКАТ. Экспрессию дифференцировочных маркеров на МНК оценивали с использованием двойной метки флуоресцирующими красителями – флуоресцеина-5-изотиоционатом (ФИТЦ) и R-фикоэритрином (PE) («Beckman Coulter», США).

Для определения экспрессии молекул Toll-подобных рецепторов (TLR) – TLR2, TLR4 на моноцитах периферической крови МНК смешивали с МКАТ к CD14 (маркер моноцитов), мечеными ФИТЦ («Beckman Coulter», США), после этого добавляли МКАТ к CD282 (TLR2) или CD284 (TLR4), меченые Alexa Fluor 488 (e-Biosciences). Результат оценивали с помощью проточной цитометрии: определяли число CD14-позитивных клеток, экспрессирующих TLR2 или TLR4.

Определение концентрации IgM, IgG, IgA в сыворотке крови и моче проводили иммунотурбидиметрическим методом с использованием автоматического биохимического анализатора PLab 650 (Япония, Италия).

Определение концентрации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке осуществляли методом осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000), результат выражали в условных единицах.

Определяли уровни провоспалительных и противовоспалительных цитокинов – IL-1 β , Ra-IL-1 β (антагонист рецепторов IL-1 β), IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A и компонентов комплемента (C3 и C4) в сыворотке крови и утренней моче методом ИФА в системе бидетерминантного определения антигена с применением пероксидазы в качестве индикаторного фермента с использованием стандартных наборов (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург) в соответствии с методикой производителя тест-наборов на иммуноферментном анализаторе BioRad Evolis Twin Plus (BioRad, Франция).

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ «Statistica – v. 10.0» («StatSoft Inc.», США). Предварительно определяли значения изучаемых показателей на соответствие нормальному распределению с использованием метода Колмогорова – Смирнова. Данные представляли в формате Me (P₂₅ – P₇₅), где Me – медиана, P₂₅ – P₇₅ – границы варьирования индивидуальных значений показателей от нижнего до верхнего квартилей в группе исследования. Показатели группы больных сравнивали с параметрами контрольной группы с помощью непараметрического метода – критерия Манна-Уитни (p_{m-w}). Корреляционный анализ осуществляли по непараметрическому методу Спирмена.

Результаты. Число отобранных в исследование больных ПИГН составило 60 человек, контрольная группа включала 30 практически здоровых лиц. В группе больных были 19 женщин и 41 мужчина. Средний возраст больных составил 31 \pm 8,5 лет. В типичном слу-

чае диагноз ПИГН выставляли пациентам, у которых имелись такие клинические проявления, как отеки различной степени выраженности (у 61,6% больных), повышение артериального давления (37% больных), олигурия (26%), потемнение цвета мочи (34%), которые возникали через 1-3 нед после перенесенной стафилококковой, стрептококковой, клебсиеллезной или вирусной инфекции или во время манифестации перечисленных инфекций. У 37% не было клинических проявлений заболевания.

Ассоциированная с ПИГН инфекция проявлялась в виде фарингита, тонзиллита, пиодермии, флегмоны, острой респираторной инфекции верхних дыхательных путей, цистит-уретрита, холангита, инфекционного эндокардита перед развитием ПИГН или во время ПИГН. Лабораторные маркеры инфекций выявлялись бактериологическими и/или молекулярно-генетическими методами исследования у 90 % пациентов: *Streptococcus pyogenes* – у 18,3%, *Staphylococcus aureus* – у 21,6%, *Staphylococcus haemolyticus* – у 5%, *Escherichia coli* – у 7%, *Klebsiella pneumoniae* – у 5%, вирус Эпштейна-Барр (Epstein-Barr virus) – у 10%, герпесвирус человека тип 6 (Human betaherpesvirus 6A) – у 8%, вирус гепатита В (HBV) – у 3%, вирус гепатита С (HCV) – у 2% и др. У 4 (6,6%) пациентов инфекция (преимущественно острые инфекции верхних дыхательных путей) манифестировала клинически, но не обнаруживалась при лабораторном тестировании. У 2 (3%) пациентов не было клинических симптомов инфекции, однако обнаруживался высокий титр антистрептолизина-О – более 330 Ед/л.

У 72% больных ПИГН сывороточный уровень C3-компонента комплемента был ниже 0,9 г/л (у здоровых: 0,94 - 1,88 г/л), у 14 % был снижен сывороточный уровень C4 ниже 0,1 г/л (у здоровых: 0,10 - 0,52 г/л).

Диагностическая нефробиопсия с морфологическим исследованием биоптата методом световой и иммунофлюоресцентной микроскопии потребовалась для верификации диагноза 36 пациентам ввиду малосимптомности заболевания. По результатам морфологического исследования у 34 пациентов был установлен диффузный эндокапиллярный ГН, у 2 – экстракапиллярный ГН с образованием полулуний.

При иммунофлюоресцентном исследовании биоптата с использованием МКАТ к C3, IgG, IgA, IgM у 11 (30%) из обследованных пациентов обнаружилось изолированное отложение C3, у 33 (92%) – сочетанное отложение C3 и IgG. У 1 (2,7%) больного наблюдались депозиты IgA при отсутствии C3 и других классов иммуноглобулинов.

Контрольная группа включала 9 женщин, 21 мужчину, средний возраст которых составил 35,8 \pm 8,2 лет. Значения гендерно-возрастных показателей здоровых лиц, составляющих контрольную группу, не различались от соответствующих показателей групп больных (p>0,05 для всех показателей).

Иммуно-лабораторный профиль крови у больных ПИГН. В группе больных ПИГН обнаружено увеличение в периферической крови абсолютного содержания В(CD20⁺)-клеток, уровней IgM и IgA (табл. 1). Результаты изучения экспрессии дифференцировочных маркеров на Т-лимфоцитах больных свидетельствовали об уменьшении относительного содержания Т(CD3⁺)-клеток и абсолютного числа Тreg-клеток – Т-хелперных клеток, имеющих высокую экспрессию маркера CD25. Кроме того, у больных оказалось увеличено число кле-

ток (CD14⁺), экспрессирующих CD282 (TLR2). Уровни компонентов комплемента C3 и C4 при ПИГН были существенно снижены, а концентрация ЦИК – повышена.

Иммуно-лабораторный профиль мочи у больных ПИГН. С целью нивелирования влияния фильтрационной функции почек на показатели содержания иммуноглобулинов, C3, C4 и цитокинов в моче, рассчитывали нормализованные показатели данных биосубстратов как отношение их абсолютных показателей к уровню креатинина в моче. Анализ полученных показателей выявил существенное повышение в группе больных ПИГН нормализованных показателей C3 и иммуноглобулинов – IgA и IgG (табл. 2). IgM не обнаруживался в моче ни у больных, ни у здоровых лиц.

Цитокины в сыворотке крови и моче у больных ПИГН. Сывороточные уровни всех изучаемых цитокинов, за исключением IL-4, у больных ПИГН превышали соответствующие показатели у здоровых (табл. 3). Нормализованные показатели содержания в моче всех исследуемых провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-2, IL-8, IL-17A) и противовоспалительного цитокина – IL-10 у больных были повышены, в то время как уровни IL-4 и RaIL-1β не отличались от аналогичных показателей группы здоровых лиц.

Корреляционные связи уровней цитокинов с иммунологическими показателями. Результаты корреляцион-

ного анализа демонстрировали наличие связи сывороточных уровней цитокинов преимущественно с такими показателями, как относительное число CD14⁺ TLR2⁺-клеток, содержание C3 в сыворотке крови. В частности, процентное содержание CD14⁺ TLR2⁺-клеток коррелировало с уровнями IL-1β ($r_s = 0,36, p_{rs} = 0,022$), IL-10 ($r_s = -0,46, p_{rs} = 0,022$). Концентрация C3 имела отрицательные связи с уровнями IL-1β ($r_s = -0,34, p_{rs} = 0,031$) и IL-4 ($r_s = -0,71, p_{rs} = 0,021$).

Что касается корреляционных связей мочевых уровней цитокинов с иммунологическими показателями, наибольшее число связей выявлено у нормализованного показателя IL-1β, коррелировавшего с иммунологическими параметрами мочи – уровнями IgA ($r_s = 0,60, p_{rs} = 0,018$), IgG ($r_s = 0,44, p_{rs} = 0,024$), а также сывороточными уровнями C3 ($r_s = -0,32, p_{rs} = 0,030$), IgA ($r_s = -0,34, p_{rs} = 0,031$) и числом CD14⁺ TLR2⁺-клеток в крови ($r_s = 0,52, p_{rs} = 0,019$).

Изучение корреляционных связей между сывороточными и мочевыми уровнями цитокинов позволило обнаружить существование прямой связи между сывороточным уровнем IL-1β и нормализованным значением содержания данного цитокина в моче ($r_s = 0,59; p_{rs} = 0,001$). У других цитокинов сывороточные уровни не коррелировали ни с абсолютными, ни нормализованными значениями их содержания в моче.

Таблица 1

Иммунологические показатели крови у больных ПИГН и здоровых лиц

Показатели	Больные ПИГН, n=60	Здоровые, n=30	$p_{m-w} <$
	Me (P ₂₅ - P ₇₅)	Me (P ₂₅ - P ₇₅)	
CD3 ⁺ -клетки абс.	960 (410 - 1410)	1248(902 - 1634)	0,01
CD3 ⁺ CD4 ⁺ -клетки, абс.	637 (264 - 1024)	758 (508 - 992)	NS
CD3 ⁺ CD8 ⁺ -клетки, абс.	414,2 (198 - 650)	468 (242 - 688)	NS
CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD3 ⁺ CD8 ⁺	1,44 (1,01 - 2,19)	1,5 (1,21 - 2,1)	NS
CD4 ⁺ CD25 ^{high} - клетки, абс.	62 (36 - 76)	78 (41 - 94)	0,05
CD20 ⁺ -клетки, абс.	326(160 - 740)***	289 (122 - 426)	0,001
CD95 ⁺ -клетки, абс.	271 (200 - 687,5)	392 (234 - 522)	NS
CD14 ⁺ CD282 ⁺ -клетки, %	73,3 (56 - 82)	52 (44 - 65)	0,001
CD14 ⁺ CD284 ⁺ -клетки, %	46 (30 - 58)	42 (31 - 54)	NS
C3, г/л	0,48 (0,21 - 0,83)	1,45 (0,94- 1,88)	0,001
C4, г/л	0,11 (0,04 - 0,31)	0,36 (0,10 - 0,52)	0,01
IgM, г/л	2,1 (0,93 - 2,7)***	1,17(0,45 - 1,4)	0,001
IgG, г/л	10,64 (5,6 - 19)	12,3(7,2 - 15,8)	NS
IgA, г/л	2,81(1,18 - 3,84)***	1,6(0,75 - 2,2)	0,001
ЦИК, усл. ед.	26,2 (6,1 - 35,3)	16,1 (4,2 - 24,1)	0,01

Примечание. абс. – абсолютное содержание в 1 л (×10⁶/л), NS – различие не достоверно ($p_{m-w} > 0,05$).

Таблица 2

Иммунологические показатели мочи у больных ПИГН и здоровых лиц

Показатель	Больные ПИГН, n=60	Здоровые, n=30	$p_{m-w} <$
	Me (P ₂₅ - P ₇₅)	Me (P ₂₅ - P ₇₅)	
C3	0,0018 (0,001 - 0,006)	0,001 (0,000 - 0,002)	0,01
C4	0,0006 (0,000 - 0,002)	0,0006 (0,000 - 0,002)	NS
IgA	0,187 (0,000 - 0,378)	0,002 (0,000 - 0,012)	0,01
IgM	0	0	
IgG	1,316 (0,095 - 2,400)	0,070 (0,000 - 0,352)	0,001
Креатинин	5,0 (1,0 - 11,6)	11,3 (4,6- 19,3)	0,001

Примечания: норм. – нормализованные по креатинину мочи значения уровней компонентов комплемента и иммуноглобулинов в мг/мкмоль креатинина мочи; NS – различие не достоверно ($p_{m-w} > 0,05$).

Обсуждение. В последние десятилетия произошли существенные изменения эпидемиологических и этиологических характеристик ПИГН. Стрептококк перестал быть преобладающим этиологическим агентом. По результатам нашего исследования, ассоциация ПИГН с *Streptococcus pyogenes* выявлялась в 18,3%. В 23% случаев обнаруживалась связь ПИГН с вирусными инфекциями. О расширении спектра возбудителей инфекций, обуславливающих развитие ПИГН, свидетельствуют данные многих авторов. Так показано, что ПИГН может вызываться вирусами гриппа, Эпштейна-Барр, Коксаки, гепатитов В и С, аденовирусами, эховирусом 9 типа, а также паразитами (малярийные плазмодии) [6, 7]. В странах с высоким социальным уровнем жизни развитию ПИГН часто предшествуют преморбидные почечные повреждения разной степени выраженности, связанные с диабетической нефропатией, хроническим алкоголизмом, инфекционным эндокардитом, внутривенным введением наркотических веществ. В этих случаях заболевание чаще запускается инфекцией *Staphylococcus aureus* на фоне имеющихся у пациентов иммунологических расстройств [3]. У 21,6% обследуемых нами пациентов была обнаружена ассоциация заболевания с *Staphylococcus aureus*. Если ранее ПИГН, имеющий стрептококковую этиологию, считали заболеванием с благоприятным течением и благополучным исходом, то в современных условиях ПИГН нередко проявляется быстро прогрессирующим ГН и часто имеет хроническое течение. В настоящем наблюдении у 5,5% больных заболевание развивалось как экстракапиллярный ГН с образованием полулуний, приобретало быстро прогрессирующее течение, осложняясь терминальной почечной недостаточностью.

В основе ПИГН лежит иммунокомплексное повреждение клубочков [8]. У 86% обследованных нами больных выявлялась гипокплементемия. При исследовании биопсийного материала в 92% случаев были обнаружены отложения в клубочках С3 и иммуноглобулинов. Депозиты иммунных комплексов в клубочках приводят

к активации системы комплемента. Преобладание депозитов С3 в пораженных клубочках свидетельствует об активации системы комплемента по альтернативному пути. Продукт активации системы комплемента компонент С5а, играющий роль хемоаттрактанта, обуславливает экстравазацию клеток воспаления – преимущественно нейтрофилов и моноцитов и накопление их в местах отложения иммунных комплексов или антигенов. Активированные клетки воспаления продуцируют провоспалительные медиаторы, повреждающие клубочки. Кроме того, эффекторное звено системы комплемента – С5b-С9 обеспечивает лизис клеток клубочков за счет образования пор в клеточных мембранах, завершая иммунокомплексную реакцию в клубочках [9]. Хотя результаты морфологических исследований и представляют убедительные доказательства иммунопатологической природы ПИГН, однако остаются неясными многие детали иммунологических расстройств, сопутствующих развитию данного заболевания.

Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что ПИГН развивается на фоне активации врожденного иммунитета, подтверждением чего является повышенная экспрессия на моноцитах TLR, относящихся к патогенраспознающим рецепторам. Описано 10 различных видов TLR у человека [10]. Среди них наиболее значимы в развитии протективного антибактериального иммунного ответа два вида TLR – TLR2 и TLR4, первый из которых обеспечивает распознавание паттернов грамположительных бактерий (пептидогликаны, липотейхоевые кислоты мембран), а второй – мембранные липополисахариды грамотрицательных микроорганизмов [11, 12]. У больных ПИГН повышена экспрессия на моноцитах TLR2, что можно объяснить связью развития заболевания с инфекциями, вызванными преимущественно грамположительными кокковыми бактериями (стафилококки, стрептококки). Опосредованное TLR распознавание патогенов клетками врожденного иммунитета играет важную роль в индукции провоспалительного иммунного ответа, необходимого

Таблица 3

Уровни цитокинов в сыворотке крови и моче у больных ПИГН и здоровых лиц

Цитокины	Больные ПИГН, n=60		Здоровые, n=30		P _{m-w} ^{<}
	Me (P ₂₅ - P ₇₅)		Me (P ₂₅ - P ₇₅)		
Сыворотка крови					
IL-1β	пкг/мл	26,2 (5,3 - 60,7)	0,4 (0,1 - 26,8)		0,001
IL-2	пкг/мл	40,6 (18,1 - 604,7)	11,3 (8,4 - 29,4)		0,001
IL-4	пкг/мл	1,6 (1,4 - 1,7)	1,8 (0,4 - 4,9)		NS
IL-8	пкг/мл	229,7 (84,7 - 1573,0)	23,3 (17,1 - 47,0)		0,001
IL-10	пкг/мл	13,0 (6,7 - 28,2)	3,1 (2,5 - 8,9)		0,001
IL-17A	пкг/мл	115,4 (40,6 - 226,7)	40,6 (29,6 - 128,1)		0,01
RaIL-1β	пкг/мл	455,1 (308,9 - 609,2)	275,8 (204,0 - 538,5)		0,001
Моча					
IL-1β	норм.	0,60 (0,01 - 16,22)	0,00 (0,00 - 0,01)		0,001
IL-2	норм.	3,13 (1,24 - 34,73)	1,16 (0,64 - 6,51)		0,01
IL-4	норм.	0,22 (0,11 - 3,36)	0,21 (0,12 - 0,53)		NS
IL-8	норм.	3,75 (1,25 - 25,06)	0,02 (0,00 - 3,66)		0,001
IL-10	норм.	0,69 (0,41 - 1,99)	0,27 (0,15 - 0,57)		0,001
IL-17A	норм.	7,33 (3,14 - 36,52)	4,55 (2,50 - 11,57)		0,001
RaIL-1β	норм.	76,6 (22,3 - 289,7)	67,5 (48,4 - 154,9)		NS

Примечание. норм. – нормализованное по креатинину мочи значение уровня цитокина в пг/мкмоль креатинина мочи; NS – различие не достоверно (p_{m-w} > 0,05).

для элиминации инфекции. Однако воспалительная активация при определенных обстоятельствах может быть неконтролируемой и преувеличенной, что обуславливает развитие аутоиммунного процесса. Результаты исследований J. Lichtneker и соавт. [13] свидетельствуют о повышенной экспрессии на мезангиальных клетках почек TLR2 и подтверждают патогенетическую роль TLR2 в развитии ГН.

TLR необходимы для инициации эффективного врожденного иммунного ответа на ранней стадии инфекции, в то время как на более поздних стадиях эти же патоген-распознающие рецепторы регулируют генерацию адаптивного иммунного ответа [14]. Действительно, иммунологические показатели крови свидетельствуют об активации гуморального механизма адаптивного иммунитета (увеличение абсолютного числа В-лимфоцитов, повышение сывороточных уровней IgM и IgA). Не укладывается в картину повышения функциональной активности В-лимфоцитов, проявляющейся усилением антителопродукции, отсутствие повышения уровня основного класса сывороточных иммуноглобулинов – IgG. Объяснение этому факту можно найти в иммунологических показателях мочи. Содержание IgG в моче почти в 2 раза превышает у больных ПИГН показатель здоровых, что, по всей видимости, и обуславливает снижение уровня IgG в сыворотке крови. Повышенная экскреция IgG с мочой при ПИГН связана с повышенной проницаемостью клубочкового фильтра. К тому же уровень сывороточного IgG может снижаться за счет отложения IgG в клубочках в составе иммунных комплексов. Исследование биоптата является тому подтверждением: в 33 из 36 проведенных морфологических исследований обнаружены отложения IgG в сочетании с отложениями С3. Медиана сывороточного уровня другого класса иммуноглобулинов – IgA – могла бы иметь более высокие значения, чем есть на самом деле, если так же, как и IgG, не экскретировался бы с мочой. Депозиты IgA в клубочках почек встречаются при ПИГН редко – лишь у 2,7 % больных, и, следовательно, не могут оказывать существенного влияния на его сывороточный уровень. Содержание IgM в сыворотке крови у больных ПИГН превышало соответствующий показатель здоровых в 1,8 раза, что является отражением повышенной антителопродукции при ПИГН. IgM не экскретируется с мочой, поскольку не может пройти через клубочковый фильтр даже в условиях повышенной его проницаемости вследствие громоздкости своей молекулы.

Активация гуморального звена адаптивного иммунитета сопровождается депрессией клеточного его компонента, о чем свидетельствует снижение экспрессии на лимфоцитах основного маркера Т-клеток – CD3 и маркера ранней активации данных клеток – CD25. Заслуживает особого внимания в изменениях клеточного звена адаптивного иммунитета уменьшение абсолютного числа клеток с фенотипом CD4⁺CD25^{high} – Т-клеток, имеющих высокую плотность экспрессии CD25. Известно, что в составе клеток указанного фенотипа преобладают регуляторные клетки (Treg-клетки) [15], выполняющие роль супрессорных клеток в иммунном ответе. Treg-клетки экспрессируют высокоаффинные рецепторы к IL-2. В процессе развития иммунного ответа IL-2, продуцируемый активированными Т-клетками, обуславливает увеличение числа Treg-клеток и усиливает супрессивную активность последних [16]. Treg-клетки обладают противовоспалительным действием, сдерживают

активность эффекторных клеток (Teff), принадлежащих к субпопуляции Т-хелперных клеток – Th17 [17]. В экспериментах на животных и *in vitro* было продемонстрировано, что удаление Treg-клеток приводит к спонтанной лимфолиферации, гипергаммаглобулинемии и развитию аутоиммунного процесса. Treg-клетки имеют решающее значение для поддержания периферической толерантности к собственным антигенам организма и предотвращения развития иммунопатологии [18]. Уменьшение числа Treg-клеток, выявленное у больных ПИГН, может быть ключевым звеном иммунопатогенеза данной гломерулопатии, что подтверждается известными из литературы данными о связи сниженного содержания Treg-клеток в крови с прогрессирующим поражением клубочков у мышей с экспериментальным ГН [19].

Таким образом, дебют ПИГН связан с активацией клеток врожденного иммунитета, экспрессирующих патогенраспознающие рецепторы – TLR2 в ответ на инфекцию, вызванную преимущественно грамположительными микроорганизмами. Мы не исключаем возможность повышенной экспрессии при ПИГН и других видов TLR. Так, результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о связи развития ГН с гиперэкспрессией TLR3 и TLR8 [20]. Вслед за активацией клеток врожденного иммунитета активируется адаптивный иммунитет, в частности его В-клеточное звено, на фоне депрессии Т-клеточного звена и нарушения иммунорегуляции за счет сокращения численности Treg-клеток.

Инициация активности клеток врожденного иммунитета сопровождается запуском каскадной продукции цитокинов [21], что объясняет обнаруженное нами при ПИГН повышение сывороточных и мочевых уровней про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-10, IL-17A). Исключением являлись противовоспалительные цитокины – IL-4 и RaIL-1 β . Содержание первого из них не изменялось ни в крови, ни в моче, а содержание второго было повышенным в крови, но сохранялось на уровне здоровых в моче. Результаты других исследователей также подтверждают существование общей тенденции к повышению уровней провоспалительных цитокинов при различных формах ГН [4, 22]. Корреляционный анализ выявил тесную связь уровней цитокинов с различными компонентами врожденного и приобретенного иммунитета. Наибольшее число корреляционных связей обнаружено у сывороточного и мочевого уровней IL-1 β – раннего провоспалительного цитокина, продуцируемого в почках внутривисцеральными макрофагами, мезангиальными клетками и подоцитами [23]. Известно, что рецептор членов семейства IL-1 имеет цитоплазматический сегмент, гомологичный внутриклеточному участку TLR – домен TIR (*om Toll-IL-1 Receptor*) и может использовать путь активации TLR, активируя клетки врожденного иммунитета [24]. IL-1 β инициирует рекрутирование клеток воспаления – макрофагов и нейтрофилов в почках [25], проявляет корреляционную связь с показателями врожденного иммунитета – числом CD14⁺ TLR2⁺-клеток, уровнем С3, изменения которых, в частности увеличение TLR2⁺-моноцитов и снижение уровня С3 в связи с активацией системы компонента по альтернативному пути, имеют патогенетическую роль при ПИГН. IL-1 β индуцирует по механизму цепной реакции образование других – поздних провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8 и IFN- γ)

[26]. Действительно, в группе обследованных нами больных ПИГН был повышен уровень IL-8 как в крови, так и моче. Результаты исследования N. Vesbas и соавт. [27] демонстрировали в гломерулярных клетках у детей с ПСГН повышенную экспрессию генов IL-8, коррелировавшую положительно с эндокапиллярной пролиферацией в клубочках. Обнаруженный нами повышенный уровень IL-17A у больных ПИГН может играть важную роль в повреждении почек, способствуя хемотаксису нейтрофилов, накоплению макрофагов в клубочках и блокируя супрессирующие свойства Treg-клеток [28].

Активация врожденного иммунитета и системы провоспалительных цитокинов обуславливает стимуляцию адаптивного иммунитета и связанного с ним ряда цитокинов – IL-2, IL-4, IL-10. Известно, что последние два цитокина оказывают противовоспалительное действие, обуславливая включение процессов репарации и завершения воспаления [29]. В соответствии с результатами настоящего исследования, в дебюте ПИГН обнаруживается стимуляция продукции IL-10, однако продукция IL-4 остается на уровне здоровых. Известные из литературы экспериментальные данные об участии IL-10 в патологических процессах, происходящих в клубочках, противоречивы. Опубликованы данные, свидетельствующие как о повреждающем, так и нефропротективном действии IL-10 при гломерулопатиях [30]. Неоднозначна роль в развитии гломерулопатий и другого цитокина, продуцируемого клетками адаптивного иммунитета – IL-2. Описано обнаружение ассоциации обострения IgA-нефропатии и развития почечной недостаточности с повышением уровня IL-2 [31], в то же время было продемонстрировано нефропротективное действие данного цитокина при фокально-сегментарном гломерулосклерозе [32]. Разгадка разнонаправленного влияния IL-2 на патологические процессы в почках может скрываться в дозозависимости биологических эффектов данного цитокина. В исследованиях *in vitro* показано, что IL-2 в низких дозах способен через IL-2R усиливать активность Treg-клеток – лимфоцитов-супрессоров, этот же цитокин в высоких дозах может повышать активность эффекторных клеток (Teff), принадлежащих к субпопуляции T-хелперных клеток – Th17 [33].

Противовоспалительное влияние присуще рецепторному антагонисту IL-1β – RalIL-1β, у которого обнаружено нефропротективное влияние [34]. У обследованных нами больных мочевого уровень данного цитокина оставался на уровне здоровых лиц. Однако его содержание в крови было существенно повышено. Повышенные уровни цитокинов в сыворотке крови при ПИГН могут быть обусловлены проникновением в кровь образующихся в почках цитокинов и, следовательно, должны коррелировать с мочевыми уровнями. Однако корреляционный анализ выявил связь сывороточного и мочевого уровня лишь у одного цитокина – IL-1β – типичного провоспалительного цитокина. Отсутствие корреляции сывороточных и мочевых уровней остальных исследуемых цитокинов позволяет предположить, что на сывороточные уровни цитокинов могут влиять и другие факторы, не связанные с патологическими процессами в почках. Действительно, у большинства больных ПИГН обнаруживались различные очаги инфекции бактериальной и вирусной этиологии (в рото-, носоглотке, мочевых путях, на коже), которые могут оказывать влияние на содержание цитокинов в крови.

Подытоживая полученные данные, можно заключить, что выявленные изменения в иммунологических

показателях крови и мочи у больных ПИГН связаны с патогенетическими механизмами заболевания. Ограничением исследования является малая выборка группы больных ПИГН, включенных в исследование. Требуются дальнейшие многоцентровые исследования с использованием большей когорты больных для изучения возможности использования иммунологических показателей крови и мочи для ранней диагностики ПИГН в случаях субклинического течения заболевания или отсутствия клинических симптомов.

Выводы:

1. Отличительными чертами иммунологического профиля крови у больных ПИГН являются: гипокомплементемия (снижение уровней C3, C4), увеличение числа В-лимфоцитов, гипериммуноглобулинемия (повышение уровней IgM и IgA) на фоне уменьшения числа T (CD3⁺)-лимфоцитов и регуляторных (CD4⁺ CD25^{high}) – клеток.

2. Повышенные уровни C3, IgG и IgA выступают в качестве характерных изменений иммунологических показателей мочи при ПИГН.

3. Особенностью цитокинового профиля крови у больных ПИГН является повышение уровней про- и противовоспалительных цитокинов IL-1β, Ra-IL-1β, IL-2, IL-8, IL-10, IL-17A.

4. Для цитокинового профиля мочи у больных ПИГН характерно повышение уровней провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-2, IL-8, IL-17A и противовоспалительного цитокина – IL-10.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 5-34 см. REFERENCES)

4. Жизневская И.И., Хмелевская И.Г., Разинькова Н.С., Миненкова Т.А., Яковлева А.В. Особенности иммунного статуса у детей с острыми и хроническими гломерулопатиями. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2017; 4: 42-5. Doi: 10.21626/vestnik/2017-4/08.

REFERENCES

1. Murphy D., McCulloch C.E., Lin F., Banerjee T., Bragg-Gresham J.L., Eberhardt M.S. et al. Trends in Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *Ann. Intern Med.* 2016; 165(7): 473-81. Doi:10.7326/M16-0273.
2. Kanjanabuch T., Kittikowit W., Eiam-Ong S. An update on acute postinfectious glomerulonephritis worldwide. *Nat. Rev. Nephrol.* 2009; 5: 259-69. Doi:10.1038/nrneph.2009.44.
3. Satoskar A.A., Parikh S.V., Nadasdy T. Epidemiology, pathogenesis, treatment and outcomes of infection-associated glomerulonephritis. *Nat. Rev. Nephrol.* 2020; 16(1): 32-50. Doi:10.1038/s41581-019-0178-8.
4. Zhiznevskaya I.I., Khmelevskaya I.G., Razinkova N.S., Minenkova T.A., Yakovleva A.V. Features of the immune status in children with acute and chronic glomerulopathy. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»*. 2017; 4: 42-5. Doi: 10.21626/vestnik/2017-4/08. (in Russian)
5. Kanjanabuch T., Kittikowit W., Eiam-Ong S. An update on acute postinfectious glomerulonephritis worldwide. *Nat. Rev. Nephrol.* 2009;5(5): 259-69. Doi:10.1038/nrneph.2009.44.
6. Hunt E.A.K., Somers M.J.G. Infection-Related Glomerulonephritis. *Pediatr. Clin. North. Am.* 2019; 66(1): 59-72. Doi:10.1016/j.pcl.2018.08.005.
7. Kimmel M. Infekt-assoziierte Glomerulonephritiden [Infections-associated Glomerulonephritis]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2020; 145(4): 240-7. Doi:10.1055/a-0974-9420.
8. Mastrangelo A., Serafinelli J., Giani M, Montini G. Clinical and Pathophysiological Insights Into Immunological Mediated Glomerular Diseases in Childhood. *Front. Pediatr.* 2020; 8: 205. Doi:10.3389/fped.2020.00205.

9. Khalighi M.A., Wang S., Henriksen K.J., Bock M., Keswani M., Meehan S.M., Chang A. Revisiting post-infectious glomerulonephritis in the emerging era of C3 glomerulopathy. *Clin. Kidney J.* 2016; 9(3): 397-402. Doi: 10.1093/ckj/sfw032.
10. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011; 34(5): 637-50. Doi:10.1016/j.immuni.2011.05.006.
11. Arbour N.C., Lorenz E., Schutte B.C., Zabner J., Kline J.N., Jones M. et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat. Genet.* 2000; 25(2): 187-91. Doi:10.1038/76048.
12. Moore C.E., Segal S., Berendt A.R., Hill A.V., Day N.P. Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004; 11(6): 1194-7. Doi:10.1128/CDLI.11.6.1194-1197.2004.
13. Lichtnekert J., Vielhauer V., Zecher D., Kulkarni O.P., Clauss S., Segerer S. et al. Trif is not required for immune complex glomerulonephritis: dying cells activate mesangial cells via Tlr2/Myd88 rather than Tlr3/Trif. *American Journal of Physiology: Renal Physiology.* 2009; 296: F867-74. Doi:10.1152/ajprenal.90213.2008.
14. Manicassamy S., Pulendran B. Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Semin. Immunol.* 2009; 21(4): 185-93. Doi:10.1016/j.smim.2009.05.005.
15. Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., Bluestone J.A. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000; 12: 431-40. Doi:10.1016/s1074-7613(00)80195-8.
16. Sakaguchi S., Ono M., Setoguchi R., Yagi H., Hori S., Fehervari Z. et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 2006; 212: 8-27. Doi:10.1016/s1074-7613(00)80195-8.
17. Chen X., Murakami T., Oppenheim J.J., Howard O.M. Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 859-69. Doi:10.1002/eji.200324506.
18. Bluestone J.A., Buckner J.H., Fitch M., Gitelman S.E., Gupta S., Hellerstein M.K. et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* 2015; 7(315): 315ra189. Doi:10.1126/scitranslmed.aad4134.
19. Klinge S., Yan K., Reimers D., Brede K.-M., Schmid J., Paust H.-J. et al. Role of regulatory T cells in experimental autoimmune glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2019; 316(3): F572-81. Doi:10.1152/ajprenal.00558.2018.
20. Kimura J., Ichii O., Miyazono K., Nakamura T., Horino T., Otsuka-Kanazawa S., Kon Y. Overexpression of Toll-like receptor 8 correlates with the progression of podocyte injury in murine autoimmune glomerulonephritis. *Sci. Rep.* 2014; 4: 7290. Doi: 10.1038/srep07290.
21. Yi Y.S., Son Y.J., Ryou C., Sung G.H., Kim J.H., Cho J.Y. Functional roles of Syk in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 270302. Doi:10.1155/2014/270302.
22. Al-Eisa A.A., Al Rushood M., Al-Attayah R.J. Urinary excretion of IL-1 β , IL-6 and IL-8 cytokines during relapse and remission of idiopathic nephrotic syndrome. *J. Inflamm. Res.* 2017; 10: 1-5. Doi:10.2147/JIR.S124947.
23. Anders H.J. Of Inflammasomes and Alarmins: IL-1 β and IL-1 α in Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2016; 27(9): 2564-75. Doi:10.1681/ASN.2016020177.
24. Dinarello C.A. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Semin. Immunol.* 2013; 25(6): 389-93. Doi:10.1016/j.smim.2013.10.001.
25. Chi K., Geng X., Liu C., Cai G., Hong Q. Research Progress on the Role of Inflammasomes in Kidney Disease. *Mediators Inflamm.* 2020; 2020: 8032797. Doi:10.1155/2020/8032797.
26. De Groote D., Zangerle P.F., Gevaert Y., Fassotte M.F., Beguin Y., Noizat-Pirenne F. et al. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine.* 1992; 4(3): 239-48. Doi:10.1016/1043-4666(92)90062-v.
27. Besbas N., Ozaltin F., Catal F., Ozen S., Topaloglu R., Bakaloglu A. Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in children with acute poststreptococcal glomerulonephritis. *Pediatr. Nephrol.* 2004; 19: 864-8. Doi.org/10.1007/s00467-004-1522-0.
28. Bai J., Wu L., Chen X., Wang L., Li Q., Zhang Y. et al. Suppressor of Cytokine Signaling-1/STAT1 Regulates Renal Inflammation in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis Models. *Front. Immunol.* 2018; 9:1982. Doi: 10.3389/fimmu.2018.01982.
29. Odobasic D., Kitching A.R., Semple T.J., Holdsworth S.R. Inducible co-stimulatory molecule ligand is protective during the induction and effector phases of crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17(4):1044-53. Doi:10.1681/ASN.2005101022.
30. Ostmann A., Paust H.J., Panzer U., Wegscheid C., Kapffer S., Huber S. et al. Regulatory T cell-derived IL-10 ameliorates crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2013; 24(6): 930-42. Doi: 10.1681/ASN.2012070684.
31. Parera M., Rivera F., Egado J., Campos A. The role of interleukin 2 (IL-2) and serum-soluble IL-2 receptor cells in idiopathic IgA nephropathy. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1992; 63(2): 196-9. Doi: 10.1016/0090-1229(92)90013-e.
32. Polhill T., Zhang G.Y., Hu M., Sawyer A., Zhou J.J., Saito M. et al. IL-2/IL-2Ab complexes induce regulatory T cell expansion and protect against proteinuric CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012; 23(8): 1303-8. Doi: 10.1681/ASN.2011111130.
33. Kosmaczewska A. Low-dose interleukin-2 therapy: a driver of an imbalance between immune tolerance and autoimmunity. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15(10): 18574-92. Doi: 10.3390/ijms151018574.
34. Furuichi K., Wada T., Iwata Y., Kokubo S., Hara A., Yamahana J. et al. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Crit. Care Med.* 2006; 34(9): 2447-55. Doi:10.1097/01.CCM.0000233878.36340.10.

Малышкина А.И.^{1,2}, Сотникова Н.Ю.¹, Григушкина Е.В.¹, Крошкина Н.В.¹, Таланова И.Е.²

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИСХОДА БЕРЕМЕННОСТИ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ

¹ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ, 153045, Иваново, Россия;

²ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, Иваново, Россия

Цель: определить относительное содержание моноцитов в периферической крови, продуцирующих IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ , выявить новые критерии прогнозирования прерывания беременности до 22 недель гестации у женщин с угрозой прерывания в ранние сроки и привычным невынашиванием. Проведено обследование 91 женщины в сроке беременности 5-12 недель. Основную группу составили 59 женщин с привычным невынашиванием беременности и угрозой прерывания ранних сроков на момент исследования. В зависимости от исхода беременности основная группа была подразделена на 3 подгруппы: I подгруппа – 44 женщины, у которых беременность завершилась своевременными родами, II – 8 женщин, у кого произошли преждевременные роды, III – 8 женщин с прерыванием беременности в сроке до 22 недель (неразвивающаяся беременность или самопроизвольный выкидыш). Группу контроля составили 32 женщины с неосложненным течением беременности. Методом проточной цитофлуориметрии на FACSCantoII (Becton Dickinson, США) определялось относительное содержание IL-4+, IL-6+, IL-10+, IFN γ + моноцитов. У женщин с угрозой выкидыша ранних сроков и привычным невынашиванием процентное содержание клеток IL-4+ и IL-10+ в популяции периферических моноцитов достоверно ниже, тогда как IL-6+ клеток – выше по сравнению с группой контроля ($p=0,0001$ во всех случаях), статистически значимых различий в процентном содержании IFN γ + клеток не выявлено ($p=0,076$). При ретроспективном анализе выявлено, что в группе женщин с прерыванием беременности до 22 недель отмечалось достоверное снижение IL-10+ моноцитов в периферической венозной крови. Прогнозирование прерывания беременности до 22 недель гестации возможно при относительном содержании IL-10+ моноцитов равном 27,0% или менее (чувствительность 87,5%, специфичность 95,2%, точность 93,1%).

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности; угроза прерывания; цитокины; моноциты.

Для цитирования: Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Григушкина Е.В., Крошкина Н.В., Таланова И.Е. Прогнозирование исхода беременности у женщин с привычным невынашиванием. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 66 (10): 618-622. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-618-622>

Для корреспонденции: Григушкина Елена Владимировна, аспирант каф. акушерства и гинекологии, неонатологии, анестезиологии и реаниматологии; e-mail: kozeltkovaelena@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 29.03.2021

Принята к печати 05.05.2021

Malyshkina A.I., Sotnikova N.Y., Grigushkina E.V., Kroshkina N.V., Talanova I.E.

PREDICTION OF THE OUTCOME OF PREGNANCY IN WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGE

¹V.N. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood, Ministry of Health of Russia, Ivanovo;

²Ivanovo State Medical Academy of Russia, Ivanovo

To determine the relative content of monocytes in the peripheral blood producing IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ , to identify new criteria for predicting abortion before 22 weeks of gestation in women with the threat of early termination and recurrent miscarriage. Materials and methods. A survey of 91 women in the gestation period of 5-12 weeks was carried out. The main group consisted of 59 women with recurrent miscarriage and the threat of early termination at the time of the study. Depending on the outcome of pregnancy, the main group was subdivided into 3 subgroups: subgroup I – 44 women whose pregnancy ended in timely delivery, II – 8 women who had preterm labor, III – 8 women with termination of pregnancy up to 22 weeks (missed pregnancy or spontaneous miscarriage). The control group consisted of 32 women with uncomplicated pregnancy. The relative content of IL-4 +, IL-6 +, IL-10 +, IFN γ + monocytes was determined by flow cytometry on FACSCanto II (Becton Dickinson, USA). In women with threatened early miscarriage and recurrent miscarriage, the percentage of IL-4 + and IL-10 + cells in the population of peripheral monocytes is significantly lower, while IL-6 + cells are higher compared to the control group ($p = 0.0001$ in all cases), no statistically significant differences were found in the percentage of IFN γ + cells ($p = 0.076$). A retrospective analysis revealed that in the group of women with termination of pregnancy up to 22 weeks, there was a significant decrease in IL-10 + monocytes in the peripheral venous blood. Prediction of termination of pregnancy before 22 weeks of gestation is possible with a relative content of IL-10 + monocytes equal to 27.0% or less (sensitivity 87.5%, specificity 95.2%, accuracy 93.1%).

Key words: recurrent miscarriage; threat of interruption; cytokines; monocytes.

For citation: Malyshkina A.I., Sotnikova N.Y., Grigushkina E.V., Kroshkina N.V., Talanova I.E. Prediction of the outcome of pregnancy in women with recurrent miscarriage. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics).* 2021; 66 (10): 618-622 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-618-622>

For correspondence: Grigushkina Elena Vladimirovna, graduate student of the Department of Obstetrics and Gynecology, Neonatology, Anesthesiology and Intensive; e-mail: kozeltkovaelena@yandex.ru

Information about authors:

Malyshkina A.I., <https://orcid.org/0000-0002-1145-0563>;
 Sotnikova N.Y., <https://orcid.org/0000-0002-0608-0692>;
 Grigushkina E.V., <https://orcid.org/0000-0003-4593-3771>;
 Kroshkina N.V., <https://orcid.org/0000-0002-0428-6945>;
 Talanova I.E., <https://orcid.org/0000-0003-4950-8174>.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 29.03.2021
 Accepted 05.05.2021

Введение. Привычное невынашивание беременности остается одной из актуальных проблем современного акушерства [1, 2]. В настоящее время в патогенезе данного осложнения беременности особое внимание уделяется иммунным процессам, а в частности врожденному иммунитету [3]. Начиная с самых ранних сроков гестации, клетки врожденного иммунитета принимают участие в регуляции процессов, способствующих поддержанию толерантности к полуаллогенному плоду, развитию нормального ангиогенеза и формированию плаценты [3-5]. Цитокины, продуцируемые клетками врожденного иммунитета, участвуют в регуляции характера иммунного ответа, обеспечивая благоприятный иммунологический фон для развития беременности. При нарушении иммунологического равновесия развиваются патологические состояния, способные привести к потере желанной беременности [3,6].

Цель данной работы – определить относительное содержание моноцитов в периферической крови, продуцирующих IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ , а также выявить новые критерии прогнозирования прерывания беременности до 22 нед гестации у женщин с угрозой прерывания в ранние сроки и привычным невынашиванием в анамнезе.

Материал и методы. На базе Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н. Городкова было проведено обследование 91 женщины в сроке беременности 5-12 недель. Основную группу составили 59 женщин с привычным невынашиванием беременности и угрозой прерывания ранних сроков на момент исследования. В зависимости от исхода беременности основная группа была подразделена на 3 подгруппы: I подгруппа – 44 женщины, у которых беременность завершилась своевременными родами, II – 8 женщин, у кого произошли преждевременные роды, III – 8 женщин с прерыванием беременности в сроке до 22 нед (неразвивающаяся беременность или самопроизвольный выкидыш). Группу контроля составили 32 женщины с неосложненным течением беременности и без привычного невынашивания в анамнезе, родившие в срок. Материалом исследования служила периферическая венозная кровь. Относительное содержание IL-4+, IL-6+, IL-10+, IFN γ + клеток в

моноцитарном гейте определялось на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (Becton Dickinson, США). В работе были использованы моноклональные антитела: анти-IL-10, анти-IL-4, анти-IL-6, анти-IFN γ производства eBioscience (США). Полученные результаты обрабатывались традиционными методами статистического анализа в пакете прикладных лицензионных программ «MicrosoftOffice 2010», «Statistica 13.0», «MedCalc» С учетом нормальности распределения данные в работе были представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Различия между группами определены при помощи критериев t Стьюдента и Манна-Уитни, по критериям Колмогорова — Смирнова и Шапиро — Уилка после проверки рядов на нормальность распределения. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Поиск точки разделения, расчет чувствительности и специфичности проводился на основании построения кривой операционных характеристик (ROC-анализ).

Результаты. Анализ данных показал, что на момент обследования у женщин с угрожающим выкидышем ранних сроков и привычным невынашиванием процентное содержание клеток IL-4+ и IL-10+ в популяции периферических моноцитов было достоверно ниже, а клеток IL-6+ – выше по сравнению с группой женщин с неосложненным течением беременности ($p=0,0001$ во всех случаях). Статистически значимых различий в процентном содержании IFN γ + клеток между показателями обеих групп выявлено не было ($p=0,076$) (см. таблицу).

По данным ретроспективного анализа, при оценке относительного содержания IL-10+ моноцитов в периферической крови у женщин с угрозой прерывания и привычным невынашиванием было установлено, что у пациенток, у которых беременность завершилась самопроизвольным выкидышем или преждевременными родами, отмечалось достоверное снижение относительного содержания данных клеток по сравнению с подгруппой женщин, у которых беременность завершилась своевременными родами ($p=0,0001$ и $p=0,006$ соответственно) (рис. 1).

Содержание моноцитов, внутриклеточно продуцирующих IFN γ , IL-4, IL-10, IL-6, у женщин с угрозой прерывания и привычным невынашиванием беременности

Показатель, %	Контрольная группа (n=32)	Основная группа (n=59)	p
IFN γ +	51,37 \pm 4,21	59,9 \pm 2,06	$p=0,076$
IL-4+	53,23 \pm 2,3	30,12 \pm 1,47	$p=0,0001$
IL-6+	29,51 \pm 1,5	71,69 \pm 1,29	$p=0,0001$
IL-10+	66,07 \pm 1,94	27,54 \pm 0,93	$p=0,0001$

Примечание. p - уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями группы женщин со своевременными родами.

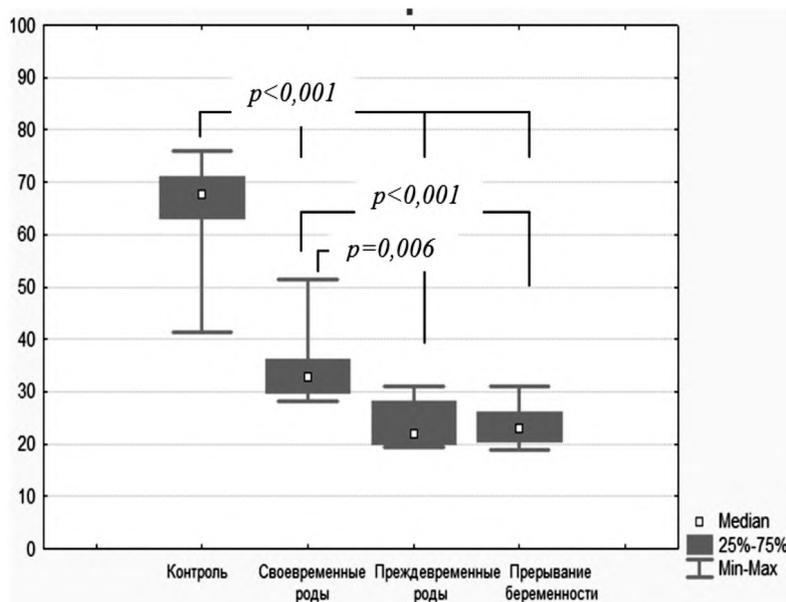


Рис. 1. Относительное содержание IL-10+ моноцитов в периферической крови у женщин с угрозой прерывания и привычным невынашиванием в зависимости от исхода беременности.

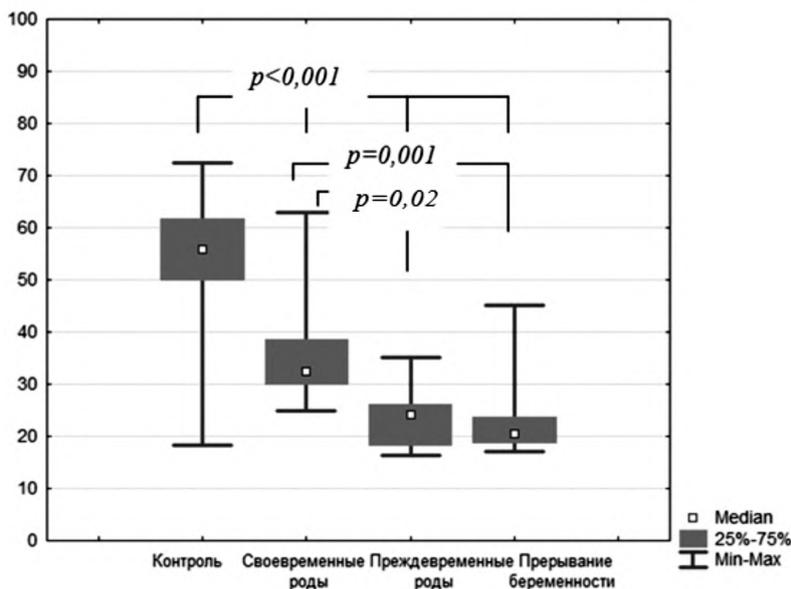


Рис. 2. Относительное содержание IL-4+ моноцитов в периферической крови у женщин с угрозой прерывания и привычным невынашиванием в зависимости от исхода беременности.

Наиболее выражено снижение относительного содержания IL-10+ моноцитов отмечалось в подгруппе женщин с прерыванием гестации до 22 нед относительно подгруппы женщин со своевременными родами. Хотя стоит отметить, что данный показатель снижался и в подгруппе женщин с угрозой прерывания и привычным невынашиванием, завершивших беременность своевременными родами, относительно группы женщин с неосложненным течением беременности ($p < 0,05$).

Аналогичные данные были получены нами при оценке относительного содержания IL-4+ моноцитов в основной группе в зависимости от исхода беременности. У женщин, завершивших беременность преждевре-

менными родами или прерыванием гестации до 22 нед, отмечалось достоверное снижение относительного содержания клеток, по сравнению с подгруппой женщин со своевременными родами ($p = 0,001$ и $p = 0,02$, соответственно) (рис. 2). Однако данный показатель также снижался и в подгруппе женщин с угрозой прерывания и привычным невынашиванием, завершивших беременность своевременными родами, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Статистически значимых различий в относительном содержании IFN γ + и IL-6+ моноцитов во всех подгруппах женщин с привычным невынашиванием беременности выявлено не было ($p > 0,05$ во всех случаях) (рис. 3, 4).

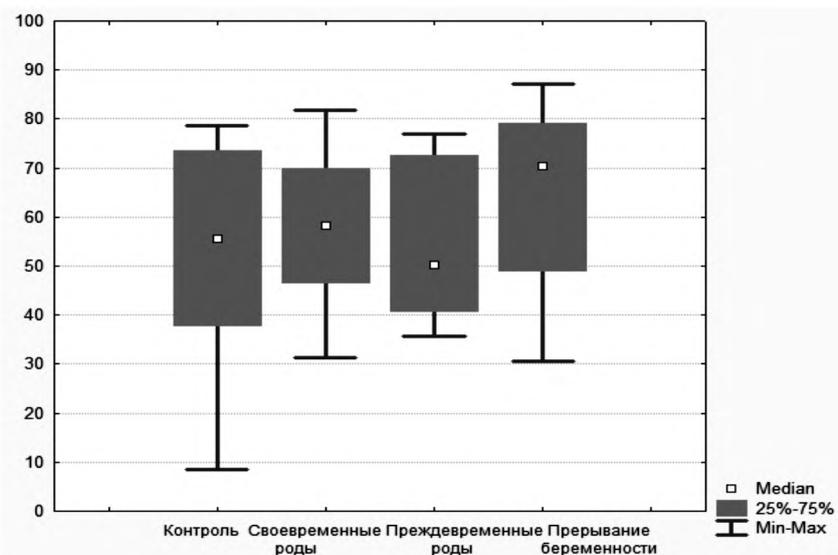


Рис. 3. Относительное содержание IFN γ ⁺ моноцитов в периферической крови у женщин с угрозой прерывания и привычным невынашиванием в зависимости от исхода беременности.

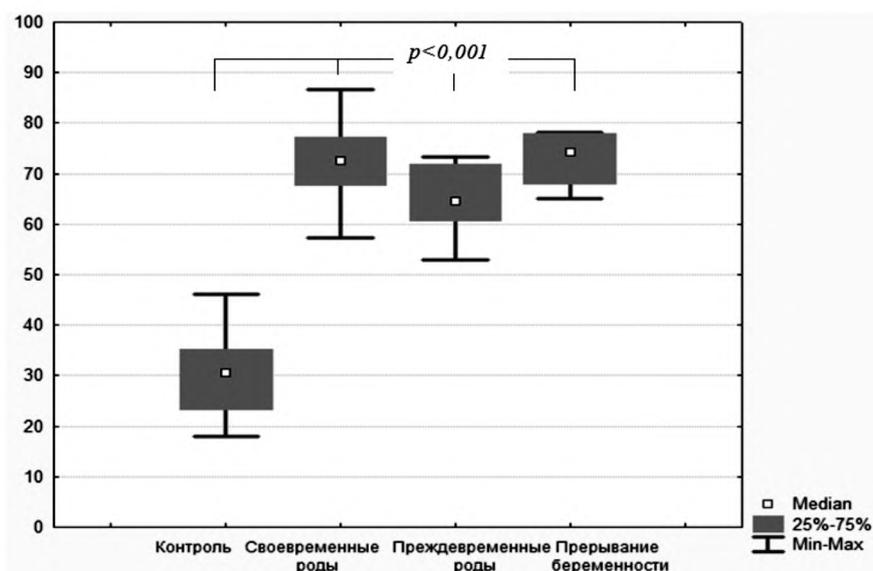


Рис. 4. Относительное содержание IL-6⁺ моноцитов в периферической крови у женщин с угрозой прерывания и привычным невынашиванием в зависимости от исхода беременности.

При относительном содержании IL-10⁺ моноцитов равном 27,0% или менее прогнозируют прерывание беременности (самопроизвольный выкидыш или неразвивающаяся беременность) до 22 недель гестации.

По результатам ROC-анализа площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,935, чувствительность способа составляет 87,5%, специфичность 95,2%, точность 93,1% (рис.5, а, б), тогда как площадь под ROC-кривой (AUC) при преждевременных родах составила 0,895. Согласно ROC-анализу данный способ более специфичен для прогнозирования прерывания беременности до 22 недель гестации. На основании этих данных был разработан «Способ прогнозирования прерывания беременности у женщин с угрозой прерывания беременности и привычным невынашиванием в анамнезе».

Обсуждение. Резюмируя все вышесказанное, у женщин с привычным невынашиванием и угрозой прерывания ранних сроков отмечалось достоверное снижение относительного содержания IL-10⁺ и IL-4⁺ моноцитов, и повышение относительного содержания IL-6⁺ моноцитов периферической крови по сравнению с контрольной группой. У пациенток с привычным невынашиванием и преждевременными родами достоверно снижалось относительное содержание IL-4⁺ моноцитов, а в группе женщин с прерыванием беременности до 22 недель гестации – снижение относительного содержания IL-10⁺ моноцитов. Известно, что клетки врожденного иммунитета и продуцируемые ими цитокины, играют важную роль на ранних этапах развития беременности, участвуя в процессах формирования плаценты и ангиогенеза, развитии эмбриона и иммунологической толерантности материнского

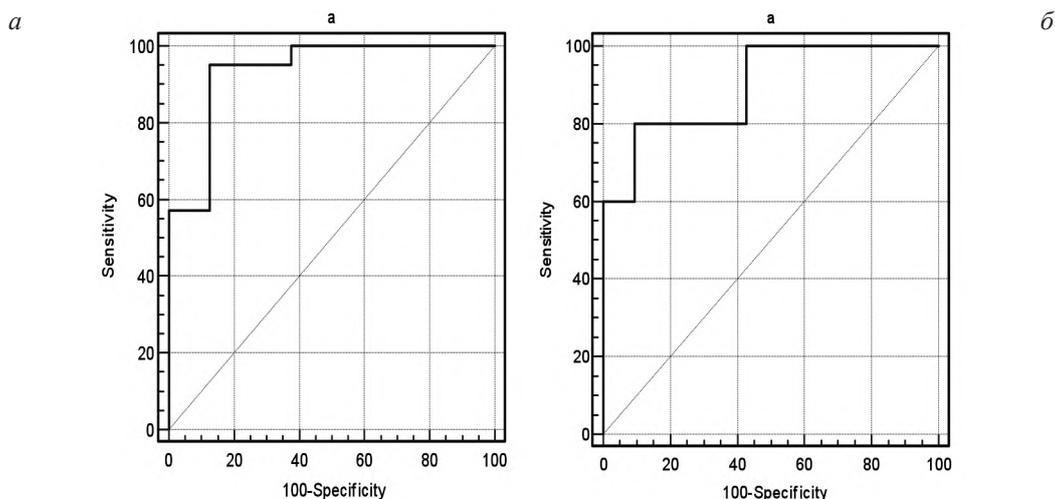


Рис. 5. ROC-анализ показателя относительного содержания IL-10+ моноцитов у женщин с угрозой прерывания и привычным невынашиванием, завершивших беременность прерыванием (самопроизвольный выкидыш или неразвивающаяся беременность) до 22 недель гестации (а) и преждевременными родами (б).

организма [4,8]. IL-10 и IL-4 – продуцирующие моноциты обладают противовоспалительными, иммуносупрессирующими свойствами, и антицитокиновыми свойствами относительно Th-1 клеток, что необходимо для успешной имплантации эмбриона и поддержания Th-2 иммунного ответа. Несмотря на то, что была обнаружена сходная динамика изменений показателей, можно предположить, что имелись иные механизмы, способные компенсировать патологические процессы при угрозе прерывания и позволяют пролонгировать беременность до определенного срока. Согласно полученным данным можно предположить, что при прерывании беременности до 22 недель наиболее быстро развивается персистирующая воспалительная реакция, нарушение ангиогенеза и развития плаценты с ранних сроков гестации. Полученные данные позволили разработать новые ранние прогностические критерии прерывания беременности до 22 недель.

Заключение. Использование в качестве дополнительного критерия прогнозирования прерывания беременности до 22 нед у женщин с угрожающим выкидышем и привычным невынашиванием по относительному содержанию IL-10+ моноцитов дает возможность своевременно проводить профилактические и лечебные мероприятия и снизить риск прерывания беременности.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5, 6 см. REFERENCES)

1. Сидельникова В.М., Сухих Г.Т. Невынашивание беременности. Руководство для практикующих врачей. М.: МИА; 2011.
3. Сотникова Н.Ю., Анциферова Ю.С., Крошкина Н.В., Воронин Д.Н. Роль клеток врожденного иммунитета в обеспечении успеха беременности на ранних сроках гестации. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2013; 62(2): 151-9.
4. Левкович М.А., Нefeldова Д.Д., Цатурян Л.Д., Бердичевская Е.М. Иммунологические аспекты проблемы невынашивания бере-

менности. *Современные проблемы науки и образования.* 2016; 3: 186.

7. Беляева М.А., Бобров С.А., Лапин С.В. Клинико-иммунологические взаимосвязи при привычном невынашивании беременности и методы их коррекции (обзор). *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова.* 2015; 7 (3):118-23.

REFERENCES

1. Sidelnikova V.M., Sukhikh G.T. Miscarriage. Guidance for practitioners [Nevynashivanieberemennosti. Rukovodstvo]. Moscow: MIA; 2011. (in Russian)
2. Sugiura-Ogasawara M. Recurrent pregnancy loss and obesity. *Best Pract.Res.Clin.Obstet. Gynaecol.* 2015; 29: 489-97.
3. Sotnikova N.Yu., Antsiferova Yu.S., Kroshkina N.V., Voronin D.N. The role of innate immune cells in ensuring pregnancy success in early gestation. *Zhurnal akusherstva I zhenskikh bolezney.* 2013; 62(2):151-9. (in Russian)
4. Levkovich M.A., Nefeldova D.D., Tsaturyan L.D., Berdichevskaya Ye.M. Immunological aspects of the problem of miscarriage. *Sovremennye problemy nauki I obrazovaniya.* 2016; 3: 186. (in Russian)
5. Manoj K. Jena, Neha Nayak, Kang Chen, Nihar R. Nayak. Role of Macrophages in Pregnancy and Related Complications. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz).* 2019; 67(5): 295–309. <https://doi.org/10.1007/s00005-019-00552-7>
6. Tsao F.Y., Wu M.Y., Chang Y.L., Wu C.T., Ho H.N. M1 macrophages decrease in the deciduae from normal pregnancies but not from spontaneous abortions or unexplained recurrent spontaneous abortions. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2018; 117: 204-211. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2017.03.011>.
7. Belyayeva M.A., Bobrov S.A., Lapin S.V. Clinical and immunological relationships in recurrent miscarriage and methods of their correction (review). *Vestnik Severo-Zapadnogo gosudarstvennogo meditsinskogo universitetaim. I.I.Mechnikova.* 2015; 7 (3):118-23. (in Russian)

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Герасимов В.Н.¹, Харсеева Г.Г.², Щербатая О.С.², Котов С.А.¹, Чепусова А.В.²

ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ СМЕШАННЫХ БИОПЛЕНОК ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИИ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА ЧЕЛОВЕКА

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», 142279 п. Оболensk, г.о. Серпухов, Московская область, Россия;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, Ростов-на-Дону, Россия

*В постэпидемический период циркуляция возбудителя дифтерии в популяции сохраняется благодаря бактерионосительству. Попадая в организм с высоким уровнем антитоксического иммунитета, возбудитель вступает в межмикробные взаимодействия с представителями условно-патогенной микрофлоры, колонизирующей респираторный тракт, и формирует биоплёнку. Материалы и методы. Моделирование процесса биоплёнкообразования осуществляли с использованием штаммов *C.diphtheriae gravis tox*⁺ №665, *C.pseudodiphtheriticum* и *S.aureus*. Образцы биоплёнок помещали на предметный столик сканирующего электронного микроскопа и напыляли золотом в напылительной вакуумной установке EicoIB-3 ioncoater (фирма «Eico», Япония) при ионном токе 6-8 мА. Полученные образцы исследовали в сканирующем электронном микроскопе JEOL 6510LB. (фирма «JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 30 кВ. Результаты. При электронно-микроскопическом исследовании образцов биоплёнок *C.diphtheriae gravis tox*⁺ №665 и условно-патогенных микроорганизмов видны группы из 2-7 молодых клеток бактерий, упакованных в единую микрокапсулу. Более объёмные скопления клеток бактерий (более 10-12) характерны для образцов биоплёнок, представленных клетками *C.diphtheriae gravis tox*⁺ №665 и *S.aureus*. На поверхности биоплёнки расположены молодые клетки бактерий с интактной структурой на различных стадиях активного деления. Конгломераты клеток бактерий, покрытые общим межклеточным матриксом, плотно прилегают друг к другу и формируют многослойную биоплёнку. Заключение. Особенности ультраструктуры биоплёнок, содержащих штаммы *C. diphtheriae* и УПМ, особенно антибиотикорезистентных, колонизирующих респираторный тракт, могут способствовать длительной персистенции *C.diphtheriae* в организме. Они не только значительно затрудняют доступ антибактериальных препаратов, но и препятствуют выделению *C.diphtheriae* при проведении культурального исследования.*

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae*; условно-патогенные микроорганизмы; респираторный тракт; ультраструктура биоплёнки.

Для цитирования: Герасимов В.Н., Харсеева Г.Г., Щербатая О.С., Котов С.А., Чепусова А.В. Особенности ультраструктуры смешанных биопленок возбудителя дифтерии и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из респираторного тракта человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (10): 623-628.

DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-623-628>

Для корреспонденции: Харсеева Галина Георгиевна, д-р мед.наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проводилось за счет средств Федерального бюджета в рамках государственного задания «Маркеры патогенности и антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов, связанных с воспалительными заболеваниями респираторного тракта».

Поступила 01.06.2021

Принята к печати 22.07.2021

Gerasimov V.N.¹, Kharseeva G.G.², Sherbataya O.S.², Kotov S.A.¹, Chepusova A.V.²

PECULIARITIES OF THE ULTRASTRUCTURE OF MIXED BIOFILMS OF THE CAUSING AGENT OF DIPHTHERIA AND CONDITIONALLY PATHOGENIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE HUMAN RESPIRATORY TRACT

¹Federal Budgetary Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Rostov State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don

*In the post-epidemic period, the circulation of the causative agent of diphtheria in the population is maintained due to the carrier of bacteria. Entering an organism with a high level of antitoxic immunity, the pathogen enters into intermicrobial interactions with representatives of the opportunistic microflora inhabiting the respiratory tract and forms a biofilm. Materials and methods. Modeling of the biofilm formation process was carried out using the strains *C.diphtheriae gravis tox*⁺№. 665, *C.pseudodiphtheriticum*, *S.aureus*. Biofilm samples were placed on the stage of a scanning electron microscope and gold-sputtered in an EicoIB-3 ioncoater vacuum deposition unit (Eico, Japan) at an ion current of 6-8 mA. The samples obtained were examined in a JEOL 6510LB scanning electron microscope. («JEOL» company, Japan) at an accelerating voltage of 30 kV. Results. Electron*

microscopic examination of samples of biofilms *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 and opportunistic microorganisms shows groups of 2-7 young bacterial cells packed into a single microcapsule. Much more voluminous accumulations of bacterial cells (more than 10-12) are typical for biofilm samples represented by *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 and *S. aureus* cells. On the surface of the biofilm, young bacterial cells with an intact structure are located at various stages of active division. The conglomerates of bacterial cells, covered with a common intermicrobial matrix, adhere tightly to each other and form a multilayer biofilm. Conclusion. Features of the ultrastructure of biofilms containing strains of *C. diphtheriae* and opportunistic bacteria, especially antibiotic-resistant bacteria inhabiting the respiratory tract, can contribute to long-term persistence of the pathogen of diphtheria in the body. They not only significantly complicate the access of antibacterial drugs, but also interfere with the isolation of *C. diphtheriae* during bacteriological research.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae*; opportunistic microorganisms; respiratory tract; biofilm ultrastructure.

For citation: Gerasimov V.N., Kharseeva G.G., Sherbataya O.S., Kotov S.A., Chepusova A.V. Peculiarities of the ultrastructure of mixed biofilms of the causing agent of diphtheria and conditionally pathogenic microorganisms isolated from the human respiratory tract. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (10): 623-628 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-623-628>

For correspondence: Kharseeva Galina Georgievna, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department for Microbiology & Virusology № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

Information about authors:

Gerasimov V.N., <https://orcid.org/0000-0002-0473-7785>;
Kharseeva G.G., <https://orcid.org/0000-0002-6226-2183>;
Sherbataya O.A., <https://orcid.org/0000-0002-0507-3853>;
Kotov S.A., <https://orcid.org/0000-0001-7403-8878>;
Chepusova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-4490-7013>.

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

Acknowledgment. The study was conducted at the expense of the Federal budget within the framework of the state task «Markers of pathogenicity and antibiotic resistance of opportunistic microorganisms associated with inflammatory diseases of the respiratory tract».

Received 01.06.2021
Accepted 22.07.2021

Инфекционные заболевания представляют серьезную угрозу человечеству. Миф о том, что в условиях современной цивилизации с бурным развитием научно-технического прогресса инфекционные болезни остались в прошлом, окончательно разрушен. Свидетельством тому явилось появление новых, не известных ранее патогенов. Не следует забывать и о старых «возвращающихся» инфекциях, к числу которых помимо кори, полиомиелита, туберкулеза, эпидемического паротита, относят дифтерию. Эти инфекции контролируются средствами массовой вакцинации, но именно из-за отказов от прививок в России в 90-е годы произошло развитие эпидемии дифтерии [1,2]. Для вакцинопрофилактики дифтерии используют препараты, содержащие дифтерийный анатоксин, который способствует формированию в организме прививаемого антитоксического, но не антибактериального иммунитета [1,2]. Вследствие этого в популяции с высоким уровнем антитоксического иммунитета сохраняется резервуар возбудителя инфекции в форме бактерионосителя токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* [1]. При снижении охвата прививками населения не минуем подъем заболеваемости дифтерией. В постэпидемический период частота выделения *C. diphtheriae* из респираторного тракта человека резко снижена. В последнее десятилетие в России заболеваемость дифтерией регистрируется только на спорадическом уровне [3]. Учитывая тот факт, что благодаря бактерионосительству элиминации возбудителя из популяции не происходит, возникает вопрос, каковы особенности существования *C. diphtheriae* в постэпидемический период в организме. *C. diphtheriae* обладает способностью формировать биоплёнку [4]. Очевидно, что попадая в организм человека с высоким уровнем антитоксического иммунитета, *C. diphtheriae* вступает в межмикробные взаимодействия с условно-патогенными

микроорганизмами (УПМ) нормальной микробиоты, колонизирующей респираторный тракт, и формирует биоплёнку. Представляет интерес выяснить особенности ультраструктуры смешанных микробных сообществ при формировании биоплёнок *C. diphtheriae* и УПМ, локализующихся на эпителии верхних дыхательных путей.

Цель исследования – изучение ультраструктуры смешанных микробных сообществ *C. diphtheriae gravis tox+* и УПМ при формировании биоплёнок *in vitro*.

Материал и методы. Исследован токсигенный штамм *C. diphtheriae gravis tox+* №665, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ Государственный научно-медицинский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, штаммы недифтерийных коринебактерий, выделенные из верхних дыхательных путей от практически здорового взрослого (*C. pseudodiphtheriticum* №1 – в количестве 10^3 КОЕ/мл) и больных с хроническим тонзиллитом (*C. pseudodiphtheriticum* №2 – в количестве 10^6 КОЕ/мл, *Staphylococcus aureus* – в количестве 10^5 КОЕ/мл) в ГАУ РО «ОКДЦ». Штамм *C. pseudodiphtheriticum* №1 обладал чувствительностью ко всем антимикробным препаратам (АМП), в соответствии с рекомендациями [5]; *C. pseudodiphtheriticum* №2 – множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) (к бензилпенициллину, эритромицину, рифампицину, линкомицину); *S. aureus* – резистентностью к метициллину.

Для исследования ультраструктуры штаммов *C. diphtheriae gravis tox+* №665, *C. pseudodiphtheriticum* №1, *C. pseudodiphtheriticum* №2, *S. aureus* биомассу микробных клеток обрабатывали 4% раствором глутарового альдегида в 0,2 М Na-какодилатном буфере, pH 7,2. Фиксацию проводили в течение ночи при температуре +4°C. Дополнительную фиксацию проводили в 4% во-

дном растворе четырёхоксида осмия на буфере Райтер-Келленбергера в течение ночи при температуре +4°C. После фиксации и отмывки в буфере клетки бактерий дегидратировали по 10 мин в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (30%, 50%, 70%, 95%) и 20 мин – в абсолютном спирте при его трёхкратной смене. Далее образцы пропитывали смесями абсолютного этанола и аралдита (соотношения 3:1, 1:1, 1:3) при +37°C в течение суток, переносили в чистый аралдит, выдерживали в вакууме (10^{-2} торр) 1,5 часа при температуре +37°C. Заливали образцы аралдитом и полимеризовали при температуре +40°C в течение ночи, затем при температуре +60°C – одни сутки, при температуре +90°C – двое суток [6]. Срезы фиксированной биомассы получали стеклянным ножом на ультрамикротоме Ultracut (ReichertJung, Австрия). Срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе TescnaG2 SpiritBioTWIN при ускоряющем напряжении 120 кВ и увеличении от 10000 до 100000 крат. Съёмку производили с помощью высококонтрастной широкоугольной CCD камеры GatanOriusSC200W 120kV, а также – CCD камеры высокого разрешения GatanOriusSC1000B 200kV. Обработку фотоснимков производили с помощью программ TescnaImagingandAnalysis, Gatadigitalmicrograph.

Электронно-микроскопическое исследование препаратов смешанных микробных сообществ *C. diphtheriae gravis tox⁺* и УПМ при формировании биоплёнок осуществляли путём погружения в среду культивирования нержавеющей подложки для поверхностной адгезии клеток бактерий, формирующих биоплёнку. Образцы биоплёнок *C. diphtheriae gravis tox⁺* №665 и *C. pseudodiphtheriticum* №1, *C. diphtheriae gravis tox⁺* №665 и *C. pseudodiphtheriticum* №2, *C. diphtheriae gravis tox⁺* №665 и *S. aureus*, адгезированных к подложке, подвергали химической фиксации. Образцы биоплёнок обрабатывали 4%-ным раствором глутарового альдегида и 40%-ным раствором формальдегида, фиксировали в течение 24 час при комнатной температуре. Указанные образцы биоплёнок после фиксации дегидратировали. Дегидратацию образцов проводили по 15 мин в охлаждённых до +4°C водных растворах этилового спирта возрастающей концентрации для предотвращения экстракции различных компонентов клеток (30%, 50%, 70%, 96%, 100%) и в 100% ацетоне (двукратно по 10 мин). Затем исследуемые образцы высушивали на воздухе.

Обезвоженные образцы биоплёнок помещали на предметный столик сканирующего электронного микроскопа и напыляли золотом в напылительной вакуумной установке EicoIB-3 ioncoater (фирма «Eico», Япония) при ионном токе 6-8 мА. Полученные образцы исследовали в сканирующем электронном микроскопе JEOL 6510LV. (фирма «JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 30 кВ.

Результаты. Начальным этапом исследования явилась характеристика ультраструктуры и качества биомасс планктонных культур штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* №665, *C. pseudodiphtheriticum* №1, *C. pseudodiphtheriticum* №2 и *S. aureus* методом ультратонких срезов. Для этого клетки бактерий заливали аралдитом и полимеризовали в объёме. Продолжительная полимеризация в мягких условиях позволила жёстко зафиксировать клетки бактерий в объёме полимера, сохраняя при этом исходную структуру микроорганизмов. Обработка четырёхокисью осмия заблокировала ферментативную

активность и стабилизировала липопротеиновые комплексы, фосфолипиды мембран, цитоплазму, нуклеоид. Реактив «окрасил» ультратонкие структуры клеток, что улучшило чёткость изображения.

Для характеристики целостности структуры биомассы с помощью электронного микроскопа TescnaG2 SpiritBioTWIN получили изображения при различной кратности увеличения. На электронно-микроскопическом изображении образца планктонной культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* №665 (рис. 1, а) наблюдаются полиморфные клетки палочковидной, кокковидной, овальной формы размером от 0,3-0,5 мкм до 0,5-2,0 мкм. Ультратонкая структура этого образца представлена следующими элементами: клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, наружная мембрана, цитоплазма. Клеточная стенка состоит из пептидогликанового слоя толщиной 10-20 нм. Цитоплазматическая мембрана гладкая или волнистая, плотно примыкает к клеточной стенке бактерий или обособлена от неё небольшим периплазматическим пространством. Наружная мембрана у значительной части образцов очень плотно граничит с наружной поверхностью клеточной стенки. Цитоплазма клетки представлена комплексом структурных компонентов: нуклеоид – светлые зоны с низкой электронно-оптической плотностью, рибосомы – мелкозернистые тёмные включения высокой электронно-оптической плотности; полисомы – тяжи различной длины.

В отдельных клетках видны небольшие вакуоли или пузырьки газа и плотные затемнённые области с размытыми контурами, которые могут представлять собой полифосфатные комплексы зёрен волютина. Видны клетки бактерий на разных стадиях бинарного деления, осуществляемого простой перетяжкой клеток с последующим образованием двух равноценных дочерних клеток. Внутриклеточный мембранный аппарат не развит.

При исследовании морфологии клеток *C. pseudodiphtheriticum* №1 (рис. 1, б) обнаружен выраженный полиморфизм: клетки имеют кокковидную (овальную, округлую), веретёнообразную, клиновидную форму. Ряд клеток имеет форму палочек размером 0,3x2,5 мкм. Некоторые клетки имеют перегородки, расположенные на латеральных концах или посередине, делящие клетку на две, не всегда равноценные дочерние клетки. Присутствуют микроорганизмы с нетипичным способом «деления», характеризующимся образованием новых, «молодых» клеток внутри материнской. В них имеются все основные органоиды: нуклеоид, цитоплазма, цитоплазматическая мембрана, клеточная стенка и другие органеллы, необходимые для поддержания жизнеспособности клетки. После завершения формирования новой клетки, материнская клетка разрушается. Ультратонкая структура клеток *C. pseudodiphtheriticum* №1 имеет такое же строение, как и *C. diphtheriae gravis tox⁺* №665 (см. рис. 1, а), но особенностью является наличие микрокапсул или слизистых чехлов у части клеток.

Особенностями морфологии отличается образец *C. pseudodiphtheriticum* №2 (рис. 1, в). Наряду с полиморфизмом и гетерогенностью микроорганизмов следует отметить выраженную склонность большого количества клеток этого фенотипа к образованию внутриклеточных перегородок, так называемых септ, которые придают клеткам характерную исчерченность. Размеры клеток варьируют от 0,5-0,8 мкм до 0,5-4,0 мкм. Толщина клеточной стенки составляет 20-30 нм, толщина септ – 40-80 нм. Многие клетки имеют микрокапсулу, толщина которой составляет 50-80 нм.

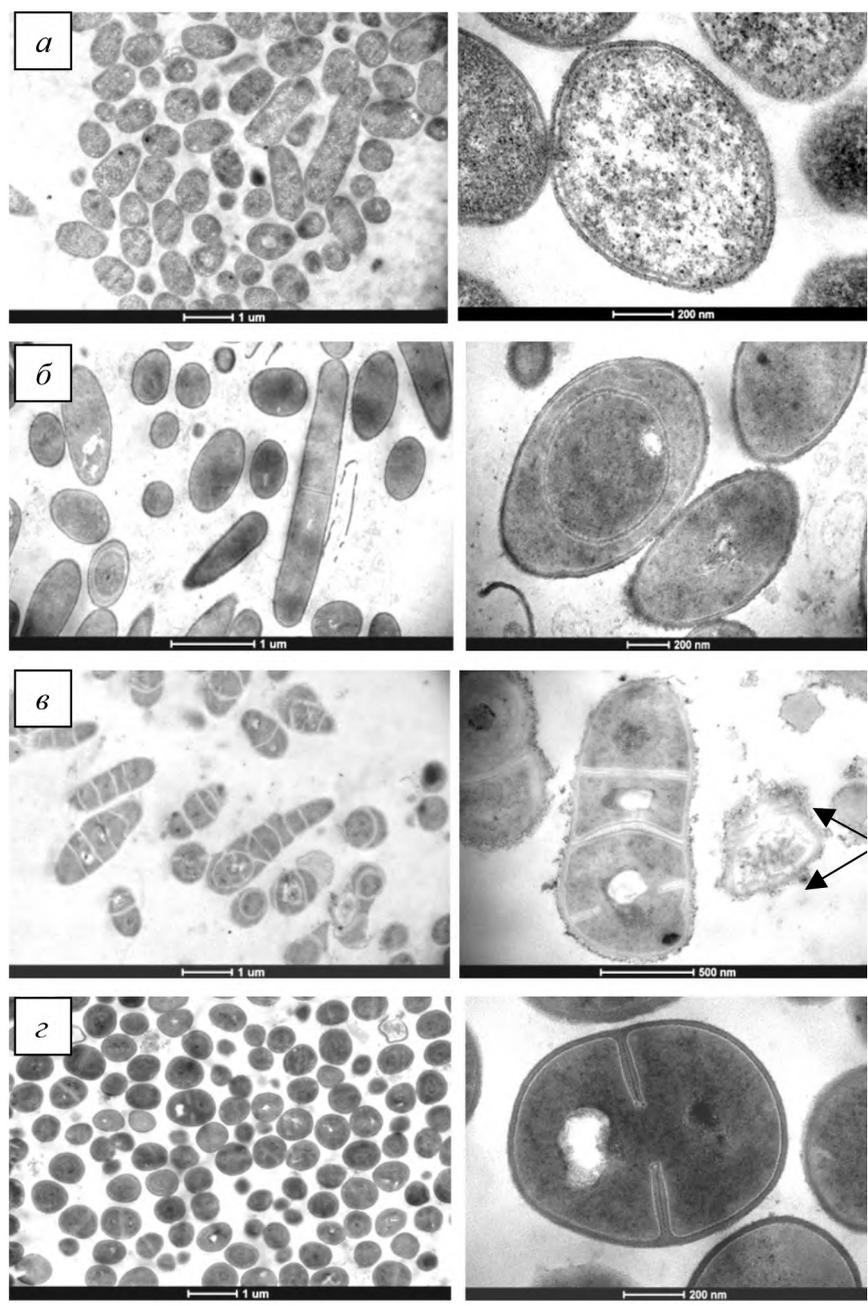


Рис.1. Электронно-микроскопическое изображение ультратонких срезов бактерий в просвечивающем электронном микроскопе TecnaiG2 SpiritBioTWIN: а – *C.diphtheriae gravis tox+* №665; б – *C.pseudodiphtheriticum* №1; в – *C.pseudodiphtheriticum* №2 (стрелкой показаны внутриклеточные перегородки – септы); г – *S.aureus*.

Клетки штамма *S.aureus* (рис.1, г) имеют кокковидную форму, одинаковое строение и размеры 0,5-0,8-1,0 мкм (в зависимости от стадии развития и деления). Клеточная стенка плотная, гомогенная, толщиной около 20 нм. Особенностью строения *S.aureus* является наличие у них мембранно-стеночного комплекса, в котором внутренняя поверхность клеточной стенки сращена с наружным листком цитоплазматической мембраны, что придает особую устойчивость этому виду бактерий. Цитоплазма неделящихся, находящихся в покое клеток, имеет однородное зернистое строение, упакована различными глобулярными и фибриллярными компонентами. В образце присутствует множество клеток на

разных стадиях деления, у которых хорошо видна врастающая от периферии к центру поперечная перегородка. Она состоит из двух лепестков цитоплазматической мембраны и ригидного слоя пептидогликана клеточной стенки, плотно примыкающих друг к другу. Цитоплазма упакована различными глобулярными и фибриллярными компонентами. Мембранный внутриклеточный аппарат не развит.

Электронно-микроскопическое исследование образцов биоплёнок *C.diphtheriae gravis tox+* №665 и УПМ выявило ряд особенностей их организации, а широкий диапазон увеличения (от x500 до x10000) позволил более подробно оценить процесс биоплён-

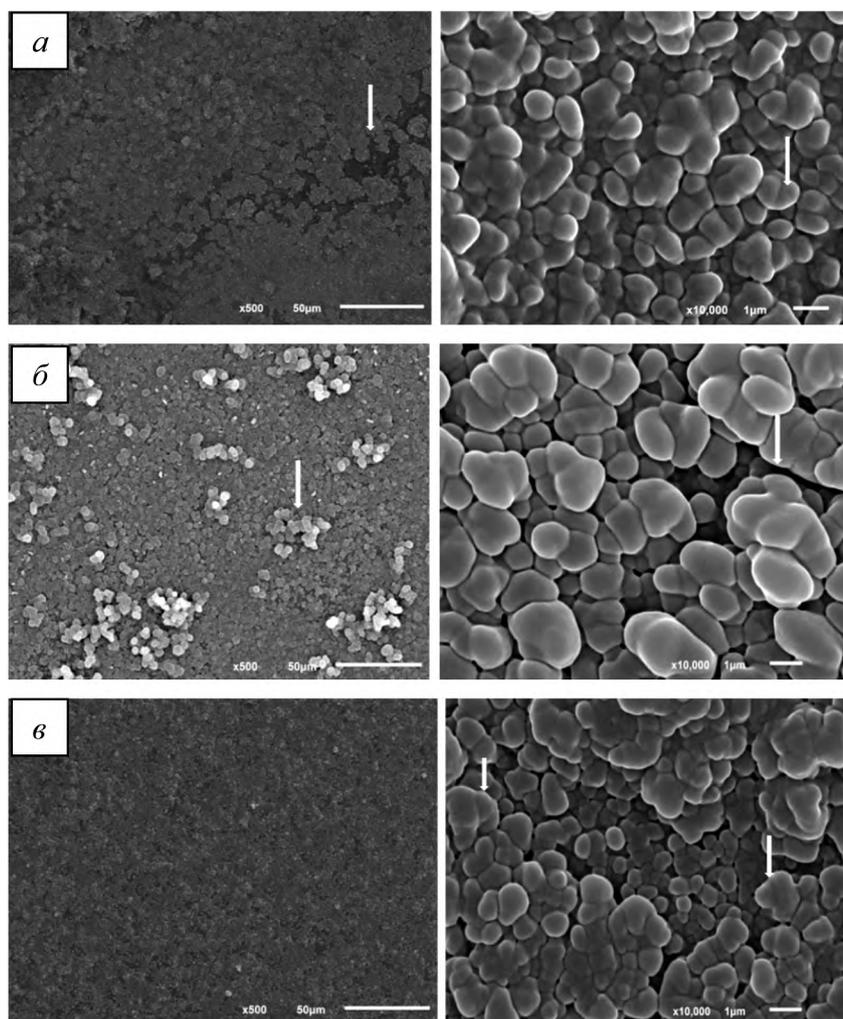


Рис. 2. Трехмерное изображение биопленок штамма *C.diphtheriae*gravistox+ №665 и условно-патогенных бактерий в сканирующем электронном микроскопе JEOL 6510LB. *a* – *C.diphtheriae* gravis tox+ №665 и *C.pseudodiphtheriticum* №1 (стрелкой указаны группы из 2-5 молодых бактериальных клеток в единой микрокапсуле); *б* – *C.diphtheriae* gravis tox+ №665 и *C.pseudodiphtheriticum* №2 (стрелкой указаны молодые бактериальные клетки с интактной структурой на поверхности биопленки); *в* – *C.diphtheriae* gravis tox+ №665 и *S.aureus* (стрелкой указаны молодые бактериальные клетки с интактной структурой на различных стадиях активного деления).

кообразования. На обзорных снимках (ув. x500) образцов биопленок *C.diphtheriae* gravis tox+ №665 и *C.pseudodiphtheriticum* №1 (рис.2, *a*) и *C.diphtheriae* gravis tox+ №665 и *C.pseudodiphtheriticum* №2 (рис.2, *б*) видны зоны активного деления бактерий и образования бактериальной биопленки.

Сплошная бактериальная биопленка представлена клетками *C.diphtheriae* gravis tox+ №665 и *S.aureus* (рис. 2, *в*). На фотографиях биопленок, образованных *C.diphtheriae* gravis tox+ №665 и штаммами *C.pseudodiphtheriticum* №1 и *C.pseudodiphtheriticum* №2 (ув. x10000) видны группы из 2-7 молодых клеток бактерий, упакованных в единую микрокапсулу.

Более объёмные скопления клеток бактерий (более 10-12) характерны для образцов биопленок, представленных клетками *C.diphtheriae* gravis tox+ №665 и *S.aureus*. На поверхности биопленки расположены молодые клетки бактерий с интактной структурой на различных стадиях активного деления. На снимках видно, что конгломераты клеток бактерий, покрытые

общим межмикробным матриксом, плотно прилегают друг к другу и формируют многослойную биопленку.

Обсуждение. Клетки бактерий исследованных штаммов коринебактерий и *S.aureus*, колонизирующих респираторный тракт, имеют определённые особенности своей морфологии. Для всех исследованных видов коринебактерий характерен полиморфизм, у штамма *C.pseudodiphtheriticum* №2 цитоплазма клеток разделена септами. Этот штамм обладает МЛЮ (к четырём АМП), что может явиться следствием формирования у него мутационной изменчивости. Мутации, затрагивающие гены, участвующие в делении клетки, могут привести к неправильной сегрегации генетического материала и нарушениям, связанными с отслоением клеточных стенок и их расхождением после завершения деления [7]. В результате этого происходит образование новых неразделённых клеток, как имеющих нуклеоид, так и лишённых нуклеоида, не несущих генетический материал. Такие особенности морфологической структуры могут существенно затруднять доступ АМП в бактериальную клетку. Формирование

неразделённых клеток бактерий, разграниченных перегородками (септами), может явиться одним из путей формирования антибиотикорезистентности у коринебактерий. Особенностью ультраструктуры клеток *S.aureus* является наличие у них мембранно-стеночного комплекса, в котором внутренняя поверхность клеточной стенки сращена с наружным листком цитоплазматической мембраны, что придает особую устойчивость этому виду бактерий.

Биоплёнки, формируемые этими видами микроорганизмов, имеют сложную, многослойную ультраструктуру. Они представлены конгломератами, состоящими из нескольких клеток бактерий, покрытых общим межмикробным матриксом. Конгломераты плотно прилегают друг к другу, формируя многослойную структуру, в которой глубоко упрятаны клетки *C.diphtheriae*. Такое расположение *C.diphtheriae* в составе биоплёнки значительно ограничивает возможность его выделения культуральным методом при лабораторной диагностике и доступ к нему АМП. Это может усугубляться и особенностями структуры обладающего МЛЮ штамма *C.pseudodiphtheriticum* №2, клетки которого разделены септами. Все это создает условия для длительной персистенции *C.diphtheriae* в организме человека и сохранения резервуара возбудителя инфекции в постэпидемический период.

Заключение. Особенности ультраструктуры биоплёнок, содержащих штаммы *C.diphtheriae* и УПМ, особенно антибиотикорезистентных, колонизирующих респираторный тракт, могут способствовать длительной персистенции *C.diphtheriae* в организме. Они не только значительно затрудняют доступ АМП, но и препятствуют выделению *C.diphtheriae* при проведении культурального исследования. В постэпидемический период при высоком уровне противодифтерийного антитоксического иммунитета в популяции сохраняется скрытое бактерионосительство, которое обусловлено, в том числе, и особенностями ультраструктуры смешанной биоплёнки в респираторном тракте носителей.

ЛИТЕРАТУРА (п. 4 см. REFERENCES)

1. Костюкова Н.Н., Бехало В.А. Дифтерийное бактерионосительство. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2018; 17(5): 60-70. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-5-60-70>.

2. Костюкова Н.Н. Уроки дифтерии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1999; 2: 92-6.
3. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации. Доступно по: <https://www.rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/>. Ссылка активна на 24 февраля 2021.
4. Таблицы пограничных значений для интерпретации значений МПК и диаметров зон подавления роста EUCAST, Версия 10.0. 2020. Доступно по: <http://www.eucast.org>. Ссылка активна на 24 февраля 2021.
5. Герасимов В.Н., Дятлов И.А., Храмов М.В., Маринин Л.И., Голов Е.А., Миронова Р.И. и др. Морфопопуляционные и ультраструктурные особенности клеток возбудителя сибирской язвы, выделенных из макроорганизма. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2010; 3: 51-5.
6. Чеботарь И.В., Боcharова Ю.А., Гурьев А.С., Маянский Н.А. Стратегии выживания бактерий в условиях контакта с антибиотиками. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (2): 116-21.

REFERENCES

1. Kostyukova N.N., Bechalo V.A. Diphtheria Carriage. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2018;17(5):60-70. doi: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-60-70. (in Russian)
2. Kostyukova N.N. The lessons of Diphtheria. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1999;2:92-6. (in Russian)
3. Infectious morbidity in the Russian Federation [Internet]. Available at: <https://www.rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials>. Accessed:24 Feb 2021. (in Russian)
4. Mandlik A., Swierczynski A., Das A., Ton-That H. Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends in Microbiology*. 2008;16(1):33-40.doi: 10.1016/j.tim.2007.10.010.
5. Tables of cut-off values for interpretation of MIC values and diameters of EUCAST growth inhibition zones, Version 10.0. 2020 [Internet]. Available at: <http://www.eucast.org>. Accessed: 24 Feb 2021. (in Russian)
6. Gerasimov V.N., Dyatlov I.A., Khramov M.V., Marinin L.I., Golov E.A., Mironova R.I. et al. Morphopopulation and ultrastructure peculiarities of cells-exciters of Siberian plague, isolated from macro-organism. *Doklady Rossiyskoy akademii sel'skokhozyaystvennykh nauk*. 2010;3: 51-5. (in Russian)
7. Chebotar' I.V., Bocharova Yu.A., Guryev A.S. Mayansky N.A. Bacteria survival strategies in contact with antibiotics. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020;65(2):116-21. doi:10.18821/0869-2084-2020-65-2-116-121. (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Бочарова Ю. А.¹, Савинова Т. А.¹, Лямин А. В.², Кондратенко О. В.², Поликарпова С. В.³, Жилина С. В.⁴, Федорова Н. И.¹, Семькин С. Ю.¹, Чаплин А. В.¹, Коростин Д. О.¹, Маянский Н. А.¹, Чеботарь И. В.¹

ОСОБЕННОСТИ ГЕНОМОВ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

¹ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия;

²ГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия;

³ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 им. О. М. Филатова» Департамента здравоохранения г. Москвы, 111539, Москва, Россия;

⁴ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница» Департамента здравоохранения г. Москвы, 119049, Москва, Россия

Муковисцидоз (МВ) – распространённое генетическое заболевание, часто проявляющееся бронхообструкцией и развитием в дыхательных путях хронического инфекционного процесса, самым распространённым возбудителем которого является Pseudomonas aeruginosa. Цель работы – определить сиквенс-типы, чувствительность к антимикробным химиопрепаратам (АМП) и гены адаптивной резистентности у штаммов P. aeruginosa, изолированных от пациентов с муковисцидозом в России.

Объект исследования – 84 штамма P. aeruginosa, выделенные из дыхательных путей 64 пациентов с муковисцидозом. Чувствительность к АМП определяли при помощи диско-диффузионного метода. Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе MGISEQ-2000. Для анализа геномов использовали программу SPAdes 3.14, платформу Galaxy, сервисы ResFinder и PubMLST. Среди исследованных изолятов обнаружено 53 различных сиквенс-типа (ST) P. aeruginosa, в том числе 6 новых ST. При этом 10% изолятов относились к клону высокого эпидемического риска ST235, 7% – к эпидемическим МВ-специфическим клонам ST17, ST242, ST274. Нечувствительность к тикарциллину/клавуланату, цефепиму и имипенему проявляли 63%, 12%, 25% штаммов, соответственно; к тобрамицину – 24%, к амикацину – 35% изолятов; к ципрофлоксацину и левофлоксацину – 35% и 57% штаммов, соответственно. Фенотип множественной резистентности (МЛУ) демонстрировали 18% изолятов. Генетические детерминанты адаптивной резистентности представлены генами бета-лактамаз VIM-2 (5 штаммов ST235), VEB-1 (два штамма ST2592), GES-1 (1 штамм ST235), PER-1 (1 штамм ST235). Ген ципрофлоксацин-модифицирующего фермента CsrP выявлен у 67% штаммов, гены аминокликозид-модифицирующих ферментов AAD, ANT и AAC – у 7%, 4% и 12% штаммов, соответственно. Изоляты P. aeruginosa, выделенные от пациентов с муковисцидозом в РФ, характеризуются высоким сиквенс-типовым разнообразием, как и при других вариантах синегнойной инфекции. Обнаруживаются эпидемические, принадлежащие к клонам высокого эпидемического риска и эндемическим МВ-специфическим клонам.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; муковисцидоз; антибиотикорезистентность; сиквенс-типы.

Для цитирования: Бочарова Ю.А., Савинова Т.А., Лямин А.В., Кондратенко О.В., Поликарпова С.В., Жилина С.В., Федорова Н.И., Семькин С.Ю., Чаплин А.В., Коростин Д.О., Маянский Н.А., Чеботарь И.В. Особенности геномов и антибиотикорезистентные свойства штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (10): DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-629-634

Для корреспонденции: Бочарова Юлия Александровна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. мол. микробиологии; e-mail: ivrin7@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 20-15-00235).

Благодарности. Мы благодарим Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ за поддержку с методической частью исследования/работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.07.2021

Принята к печати 21.07.2021

Bocharova Yu.A.¹, Savinova T.A.¹, Lyamin A.V.², Kondratenko O.V.², Polikarpova S.V.³, Zhilina S.V.⁴, Fedorova N.I.¹, Semykin S.Yu.¹, Chaplin A.V.¹, Korostin D.O.¹, Mayansky N.A.¹, Chebotar I.V.¹

GENOME FEATURES AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA STRAINS ISOLATED IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS IN THE RUSSIAN FEDERATION

¹Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russia;

²Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia;

³Filatov Municipal Clinical Hospital, 111539, Moscow, Russia;

⁴Morozov City Children's Clinical Hospital, 119049, Moscow, Russia

Cystic fibrosis (CF) is a common genetic disease, manifested by airway obstruction and chronic respiratory infection. The most prevalent infectious agent in airways of CF patients is Pseudomonas aeruginosa. This study aimed to determine sequence-types, antimicrobial resistance phenotypes and genes defining adaptive antibiotic resistance in P. aeruginosa isolates recovered from CF patients in Russia. In total, 84 P. aeruginosa strains from 64 CF patients were analyzed. Susceptibility to antibiotics was determined by disk diffusion test. Whole-genome sequencing (WGS) was performed on MGISEQ-2000 platform. SPAdes software,

Galaxy, *ResFinder*, *PubMLST* were used for analysis of WGS data. Examined *P. aeruginosa* isolates belonged to 53 different sequence-types (STs), including 6 new STs. High-risk epidemic clone ST235 (10%) and clonal CF *P. aeruginosa* strains ST17, ST242, ST274 (7%) were detected. Non-susceptibility to ticarcillin-clavulanate, cefepime, imipenem was observed in 63%, 12% and 25% of isolates, respectively; to tobramycin – in 24%, to amikacin – in 35%; to ciprofloxacin, levofloxacin – in 35% and 57% of strains, respectively. Multidrug-resistant phenotype was detected in 18% of isolates. In examined strains, genes of beta-lactamases *VIM-2* (5 ST235 strains), *VEB-1* (two ST2592 strains), *GES-1* (1 ST235 strain), *PER-1* (1 ST235 strain) were found. Ciprofloxacin-modifying enzyme *CrpP* gene was detected in 67% of isolates, aminoglycoside-modifying enzymes *AAD*, *ANT*, *AAC* genes – in 7%, 4%, 12% of strains, respectively. *P. aeruginosa* isolates from CF patients in Russia demonstrate a high clonal diversity, which is similar to other *P. aeruginosa* infections. The isolates of high-risk clone and clonal CF *P. aeruginosa* strains are detected.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; cystic fibrosis; resistance to antibiotics; sequence-types.

For citation: Bocharova Yu.A., Savinova T.A., Lyamin A.V., Kondratenko O.V., Polikarpova S.V., Zhilina S.V., Fedorova N.I., Semykin S.Yu., Chaplin A.V., Korostin D.O., Mayansky N.A., Chebotar I.V. Genome features and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in patients with cystic fibrosis in the Russian Federation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (10): 629-634 (in Russ.). DOI: https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-629-634

For correspondence: Bocharova Yu.A., MD, PhD, Senior researcher of the Laboratory of Molecular Microbiology; e-mail: ivrin7@gmail.com

Information about authors:

Bocharova Y., <https://orcid.org/0000-0003-0197-0255>;
Savinova T., <https://orcid.org/0000-0002-5484-5098>;
Lyamin A., <https://orcid.org/0000-0002-5905-1895>;
Kondratenko O., <https://orcid.org/0000-0002-7750-9468>;
Polikarpova S., <https://orcid.org/0000-0003-3201-0804>;
Zhilina S., <https://orcid.org/0000-0003-0084-1013>;
Fedorova N., <https://orcid.org/0000-0001-6244-4182>;
Semykin S., <https://orcid.org/0000-0003-1419-6756>;
Chaplin A., <https://orcid.org/0000-0003-1377-7153>;
Korostin D., <https://orcid.org/0000-0003-1343-2550>;
Mayansky N., <https://orcid.org/0000-0001-8077-5313>;
Chebotar I., <https://orcid.org/0000-0002-6691-2171>.

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (Project ID 20-15-00235).

Acknowledgment. We thank the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine (Moscow) for the genetic research methods.

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

Received 01.07.2021
Accepted 21.07.2021

Введение. Муковисцидоз (МВ) – одно из самых распространённых в мире генетических заболеваний, которое развивается в результате мутаций в гене муковисцидозного белка-регулятора трансмембранной проводимости CFTR (от англ. «cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein»), и, как следствие этого, – нарушения трансэпителиального транспорта хлорид-ионов [1-3]. Наиболее частым проявлением МВ является увеличение вязкости секрета эпителия бронхов, вызывающее развитие бронхобструкции, хронического инфекционного процесса в дыхательных путях, в результате чего формируются бронхэктазы и/или пневмофиброз [4-6]. При этом хронический инфекционный процесс выполняет решающую роль в развитии патологических изменений в лёгких. В соответствии с классификацией, определяющей клиническое значение возбудителей инфекционного процесса при МВ, одним из самых опасных микроорганизмов является *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) [2]. *P. aeruginosa* – патоген, который часто (до 70% случаев) высевается из дыхательных путей пациентов с МВ [7, 8]. При колонизации дыхательных путей *P. aeruginosa* значительно ухудшается прогноз заболевания: её наличие увеличивает показатель 8-летней смертности в 2,6 раза. У пациентов, дыхательные пути которых колонизированы *P. aeruginosa*, регистрируются низкие показатели массы тела, объёма форсированного

выдоха и частые обострения инфекционного процесса (по сравнению с пациентами, у которых этот патоген не обнаруживается) [9].

Опасность *P. aeruginosa* определяется богатым спектром факторов патогенности (адгезины, ферменты, токсины, факторы ускользания от иммунного ответа), высокой генетической пластичностью, позволяющей бактериям быстро адаптироваться к условиям окружающей среды, и широким спектром антибиотикорезистентности. Высокий уровень устойчивости к АМП у *P. aeruginosa* обеспечивается множеством генов адаптивной резистентности: генов бета-лактамаз, аминогликозид- и фторхинолон-модифицирующих ферментов [10].

Наиболее опасные резистентные штаммы *P. aeruginosa* принадлежат к клонам высокого эпидемического риска (ST111, ST175, ST235, ST654) [11-13]. Среди изолятов *P. aeruginosa*, инфицирующих пациентов с МВ, отдельно выделяют эпидемические клоны (эпидемические МВ-специфические клоны) AUST-01, AUST-02, AUST-03, Clone C, DK-1, DK-2, CC274 и др. [14]. Эпидемические МВ-специфические клоны не всегда имеют высокий уровень резистентности к АМП, но, тем не менее, ассоциированы с более тяжёлым течением инфекционного процесса по сравнению с неэпидемическими штаммами.

Цель работы – определить сиквенс-типы, оценить чувствительность к АМП и выявить наличие генов

адаптивной резистентности у штаммов *P. aeruginosa*, изолированных от пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации.

Материал и методы. Объект исследования – 84 клинических штамма *P. aeruginosa*, выделенные из верхних дыхательных путей (мазок со слизистой глубоких отделов задней стенки глотки) и мокроты 64 пациентов с муковисцидозом в возрасте от двух лет до 31 года из 29 регионов Российской Федерации в январе-феврале 2020 года. Чувствительность к АМП определяли при помощи диско-диффузионного метода. Определение чувствительности и интерпретацию результатов проводили в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов США (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2020 г.) [15]. При этом штаммы, соответствующие критериям I и R отнесены к категории нечувствительных, штаммы, соответствующие критерию S – к категории чувствительных.

Бактериальную ДНК выделяли из суточных культур исследуемых изолятов *P. aeruginosa*, выращенных на агаре Мюллера-Хинтона (Becton Dickinson), при помощи наборов QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) по протоколу фирмы-производителя. Образцы ДНК хранили при -20° С.

Для подготовки ДНК-библиотеки брали 400 нг бактериальной ДНК. ДНК-библиотеки готовили, используя ультразвуковую фрагментацию (Covaris) бактериальной ДНК с последующей репарацией концевых последовательностей и лигированием адаптеров (MGI). Очистку ДНК-библиотек проводили при помощи магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman). Концентрацию бактериальной ДНК и ДНК-библиотек измеряли при помощи прибора Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific).

Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе MGISEQ-2000 (MGI) с длиной прочтений 250 пар оснований. Для сборки бактериального генома использовали программу SPAdes 3.14 [16]. Оценка качества сборки проводилась с помощью QUAST 5.0 [17]. Контроль за полнотой сборки и исключение возможности контаминации осуществлялись с использованием программы CheckM и веб-сервера Contest16S [18, 19]. Для анализа геномов использовали платформу Galaxy и сервис ResFinder [20, 21]. Сиквенс-тип изолятов определяли в соответствии со стандартной схемой мультилокусного сиквенс-типирования для *P. aeruginosa* с использованием данных полногеномного секвенирования (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>).

Результаты. Среди исследованных изолятов обнаружено 53 различных сиквенс-типа (ST) *P. aeruginosa*, в том числе 6 новых ST. Каждый из сиквенс-типов ST1157, ST1232, ST1239, ST1665, ST1930, ST207, ST233, ST242, ST245, ST2464, ST2465, ST254, ST266, ST291, ST3005, ST308, ST358, ST412, ST446, ST500, ST526, ST575, ST645, ST655, ST845, ST882, ST9 представлен одним изолятом, все они выделены от разных пациентов. Штаммы сиквенс-типов ST198, ST231, ST274, ST319, ST708, однолокусный вариант (SLV) ST3474 (новый сиквенс-тип) обнаружены дважды, все они выделены от разных пациентов (по одному штамму от одного пациента). У 19/64 (30%) пациентов обнаружено более, чем по одному изоляту *P. aeruginosa* (табл. 1). ST235 представлен восемью изолятами, выделенными от шести пациентов, ST2554 – пятью изолятами, выделенными от двух пациентов, каждый из сиквенс-типов ST17 и ST395 – тремя изолятами, выделенными от двух пациентов. Сиквенс-типы ST1094, ST12, ST1203, ST2592, ST3451,

ST3496, ST499, ST635 и новые ST, которые являлись однолокусным вариантом ST3451 и двухлокусным вариантом (DLV) сиквенс-типа ST200, представлены парами штаммов, каждая из пар выделена от одного пациента. В большинстве случаев, когда от одного пациента выделено более одного штамма *P. aeruginosa*, распределение сиквенс-типов подчинялось закономерности «у одного пациента – штаммы *P. aeruginosa* одного ST». Исключение составили три случая, когда в парах штаммов, каждая из которых выделена от одного пациента, один изолят принадлежал к известному сиквенс-типу, второй – к SLV этого же сиквенс-типа (ST1894, ST685, ST942).

Число однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), выявленных при сравнении геномов штаммов одного сиквенс-типа, выделенных от одного пациента, было ≥ 20 , что свидетельствует о штаммовом различии изолятов (табл. 1). 8/84 (10%) изолятов относились к клону высокого эпидемического риска ST235, 6/84 (7%) – к эпидемическим MB-специфическим клонам ST17, ST242, ST274 (табл. 2).

По результатам определения чувствительности к АМП диско-диффузионным методом нечувствительность к тикарциллину/клавуланату выявлена у 53/84 штаммов (63%), 10/84 (12%) штаммов нечувствительны к цефепиму, 21/84 (25%) – к имипенему. Нечувствительность к тобрамицину и амикацину проявляли соответственно 20/84 (24%) и 29/84 (35%) изолятов. Нечувствительны к ципрофлоксацину 29/84 (35%) штаммов, к левофлоксацину – 48/84 (57%) штаммов. Фенотип множественной резистентности (МЛУ) демонстрировали 15/84 (18%) изолятов.

Генетические детерминанты адаптивной резистентности исследованных штаммов представлены генами бета-лактамаз VIM-2 (5 штаммов ST235), VEB-1 (два штамма ST2592), GES-1 (1 штамм ST235), PER-1 (1 штамм ST235). Гены bla_{GES-1} , bla_{PER-1} не сочетались ни между собой и с bla_{VIM-2} . В геномах у 56/84 (67%) штаммов обнаружен ген ципрофлоксацин-модифицирующего фермента CsrP. Гены аминогликозид-модифицирующих ферментов AAD выявлены у 6/84 (7%) изолятов, ANT – у 3/84 (4%), AAC – у 10/84 (12%), включая ген фермента AAC(6')-Ib-cr, инактивирующего фторхинолоны и аминогликозиды (1 штамм). Распределение генов адаптивной резистентности среди изолятов эпидемических клонов показано в табл. 2.

Обсуждение. Исследованные MB-изоляты *P. aeruginosa* характеризовались высоким разнообразием сиквенс-типов, что характерно и для других вариантов синегнойной инфекции [22–25]. Большинство выявленных сиквенс-типов ранее не описаны у пациентов с MB на территории РФ [26]. Исключение составили типичные MB-клоны ST233, ST235, ST245, ST274, ST575. Особую опасность представляют выявленные сиквенс-типы ST235, ST17, ST242, ST274, которые принадлежат к клонам высокого эпидемического риска. Они характеризуются всемирной распространённостью и высоким уровнем устойчивости к АМП [12]. 10% изолятов относились к ST235. По сравнению со штаммами других ST они обладали более широким набором генов адаптивной резистентности: генов карбапенемаз bla_{VIM-2} , bla_{GES-1} , bla_{PER-1} и генов аминогликозид-модифицирующих ферментов *aac*, *aad*. К сиквенс-типам международных эпидемических MB-специфических клонов ST17, ST242, ST274 принадлежало 7% исследованных изолятов. Несмотря на невысокий уровень устойчивости к АМП и небо-

Таблица 1

Сиквенс-типовая принадлежность штаммов *P. aeruginosa* в случаях, когда от одного пациента изолировано более одного штамма

Лабораторный ID штамма	№ пациента	ST	Количество SNP
324/2	1	1094	83
324/3			
325/1	2	12	1048
325/2			
294/1	3	1203	242
294/2			
41786/2	4	17	380
41786/3			
316/1	5	235	212
316/2			
41748/2	6		191
41748/3			
41724/1	7	2554	41724/1-41724/2
41724/2			41724/1-41724/3
41724/3			41724/2-41724/3
41723/1	8		1099
41723/2			
17905/1	9	2592	148
17905/2			
17898/1	10	3451	99
17898/2			
62/1	11	3496	236
62/2			
17903/1	12	395	271
17903/2			
295/1	13	499	93
295/2			
17902/1	14	635	185
17902/2			
17896-7/1	15	DLV 200*	20
17896-7/2			
417/1	16	SLV 3451*	104
417/2			
212/1	17	1894	Неприменимо**
212/2		SLV 1894*	
99/1	18	942	Неприменимо**
99/2		SLV 942*	
124/1	19	685	Неприменимо**
124/2		SLV 685*	

Примечание. * – Новый сиквенс-тип, ** – SLV рассматривается как новый сиквенс-тип, поэтому определение SNP неприменимо.

Таблица 2

Характеристики штаммов, принадлежащих к международным МВ-специфическим клонам и клону высокого эпидемического риска

Сиквенс-тип	Международное название	<i>n</i>	Гены адаптивной резистентности (<i>n</i>)
ST235*	ST235	8	<i>bla</i> _{VIM-2} (5), <i>bla</i> _{GES-1} (1), <i>bla</i> _{PER-1} (1), <i>aac</i> (8), <i>aad</i> (5)***
ST17	Clone C**	3	<i>crpP</i> (3)
ST242	AUST-03**	1	<i>crpP</i> (1)
ST274	CC274**	2	<i>crpP</i> (2)

Примечание. * – Клон высокого эпидемического риска; ** – МВ-специфические клоны; *** – ни *bla*_{GES-1}, ни *bla*_{PER-1} не сочетались ни между собой, ни с *bla*_{VIM-2}.

гаты набор генов резистентности (у штаммов ST17, ST242, ST274 обнаружен только ген ципрофлоксацин-модифицирующего фермента CsrP), изоляты эпидемических МВ-специфических клонов обычно ассоциируются с более тяжёлым течением инфекции дыхательных путей при МВ [14]. Показано, что инфекция, вызванная ST242, протекает с более частыми обострениями инфекционного процесса, требующими госпитализации, по сравнению с инфекцией, вызванной неэпидемическими сиквенс-типами.

Присутствие среди обнаруженных штаммов представителей клона высокого эпидемического риска и эпидемических МВ-клонов может свидетельствовать о внутрибольничном заражении пациентов МВ *P. aeruginosa*.

Выявлена закономерность в распределении сиквенс-типов «один пациент – штаммы *P. aeruginosa* одного сиквенс-типа». *P. aeruginosa*, находясь в дыхательных путях пациентов с МВ, непрерывно эволюционирует [27–30]. Обнаруженная закономерность косвенно подтверждает, что выделение нескольких различных штаммов *P. aeruginosa* от одного пациента является результатом эволюции в дыхательной системе, а не следствием колонизации новыми штаммами извне.

Количество выявленных нечувствительных к АМП штаммов *P. aeruginosa* соответствовало результатам отечественных работ предыдущих лет. Исключение составили показатели устойчивости к фторхинолонам: в предыдущие годы они были значительно ниже и составляли 15–20% [26]. Другие особенности касались имипенема и амикацина. При сравнении полученных значений доли нечувствительных штаммов со значениями, опубликованными в зарубежных исследованиях, наши результаты показали относительно низкое распространение устойчивости к имипенему и амикацину. Примерно 25% изолятов нечувствительны к имипенему и 35% – к амикацину, тогда как в Европе доля нечувствительных к имипенему и амикацину штаммов составляет 52% и 61%, соответственно [31].

Гены адаптивной резистентности, такие как гены карбапенемаз *bla*_{VIM-2}, *bla*_{GES-12}, *bla*_{PER-1}, выявлялись только у представителей ST235. Для большинства штаммов других сиквенс-типов характерно наличие гена ципрофлоксацин-модифицирующего фермента CsrP. Процент штаммов, несущих гены бета-лактамаз и аминогликозид-модифицирующих ферментов, значительно ниже, чем процент штаммов, нечувствительных к бета-лактамам и аминогликозидам. Это может быть объяснено наличием альтернативных механизмов резистентности к бета-лактамам и аминогликозидам – гиперэкспрессией эффлюкс-систем, снижением пориновой проницаемости, модификацией мишени действия АМП [10].

Заключение. Исследования геномных характеристик штаммов *P. aeruginosa*, изолированных от пациентов с МВ в Российской Федерации, выявили высокую степень сиквенс-типологического разнообразия, что соответствует микробиологической картине других вариантов синегнойной инфекции в России и мире. Все штаммы, выделенные от конкретного пациента, принадлежат к одному ST либо к его SLV/DLV. У пациентов с МВ обнаружены штаммы, принадлежащие к клонам высокого эпидемического риска и международным эпидемическим МВ-специфическим клоном, которые являются индикатором внутрибольничного заражения синегнойной инфекцией. Хотя в целом уровни фенотипической чувствительности *P. aeruginosa* к АМП соответство-

вали европейским и общемировым показателям, зарегистрирован тревожный рост нечувствительности к фторхинолонам.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1, 3, 5, 6, 8, 9, 11–14, 16–25, 27–31 см. REFERENCES)

2. Данные с сайта Всероссийской ассоциации для больных муковисцидозом. Available at: <https://mukoviscidoz.org/doc/konsensus/2019/konsensus-2019-bez-rentgenogramm.pdf> (дата обращения: май 2021 г.).
4. Данные с сайта Ассоциации медицинских генетиков. Available at: <http://amg-genetics.ru/pdf/mukoviscidoz.pdf> (дата обращения: июнь 2021 г.).
7. Данные с сайта Всероссийской ассоциации для больных муковисцидозом. Регистр больных муковисцидозом в РФ. Available at: https://mukoviscidoz.org/doc/registr/site_Registre_2019.pdf (дата обращения: май 2021 г.).
10. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Маянский Н.А. Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и их регуляция. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(4): 308–19.
15. Данные с сайта Института клинических и лабораторных стандартов США. Available at: <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx> (дата обращения: апрель 2021 г.).
26. Сиянова Е.А., Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Прилипов А.Г., Усачев Е.В. и др. Мониторинг хронической инфекции легких у больных муковисцидозом, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa*. *Педиатрия*. 2018; 97(2):77–86.

REFERENCES

1. Boucher R.C. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur. Respir. J.* 2004; 23(1):146–58.
2. Russian Association for patients with cystic fibrosis. Available at: <https://mukoviscidoz.org/doc/konsensus/2019/konsensus-2019-bez-rentgenogramm.pdf> (accessed May 2021). (in Russian)
3. Watson M.J., Lee S.L., Marklew A.J., Gilmore R.C., Gentzsch M., Sassano M.F. et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) uses its C-terminus to regulate the A2B adenosine receptor. *Sci. Rep.* 2016; 6:27390.
4. Association of Medical Geneticists. Available at: <http://amg-genetics.ru/pdf/mukoviscidoz.pdf> (accessed June 2021). (in Russian)
5. Kulkarni H., Kansra S., Karande S. Cystic fibrosis revisited. *J. Postgrad. Med.* 2019; 65(4):193–6.
6. Ratjen F., Bell S.C., Rowe S.M., Goss C.H., Quittner A.L., Bush A. Cystic fibrosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2015; 1:15010.
7. Russian Association for patients with cystic fibrosis. Available at: https://mukoviscidoz.org/doc/registr/site_Registre_2019.pdf (accessed May 2021). (in Russian)
8. Crull M.R., Somayaji R., Ramos K.J., Caldwell E., Mayer-Hamblett N., Aitken M.L. et al. Changing rates of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis: a population-based cohort study. *Clin. Infect. Dis.* 2018; 67(7):1089–95.
9. Emerson J., Rosenfeld M., McNamara S., Ramsey B., Gibson R.L. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2002; 34(2): 91–100.
10. Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Mayansky N.A. Mechanisms and regulation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(4): 308–19. (in Russian)
11. Oliver A., Mulet X., Lopez-Causape C., Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist. Updat.* 2015; 21–22: 41–59.
12. Aguilar-Rodea P., Zuniga G., Rodriguez-Espino B.A., Olivares Cervantes A.L., Gamino Arroyo A.E., Moreno-Espinosa S. et al. Identification of extensive drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains: New clone ST1725 and high-risk clone ST233. *PLoS One.* 2017; 12(3): e0172882.

MICROBIOLOGY

13. Oliver A. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: Role of high-risk clones in multidrug resistance. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2017; 35(3): 137-8.
14. Parkins M.D., Somayaji R., Waters V.J. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018; 31(4): e00019-18.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Available at: <http://em100.edaptivedocs.net/dashboard.aspx> (accessed April 2021). (in Russian)
16. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19: 455-77.
17. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013; 29: 1072-5.
18. Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 2015; 25: 1043-55.
19. Lee I., Chalita M., Ha S.M., Na S.I., Yoon S.H., Chun J. ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2017; 67: 2053-7.
20. Afgan E., Baker D., Batut B., van den Beek M., Bouvier D., Cech M. et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(W1): W537-44.
21. Bortolaia V., Kaas R.S., Ruppe E., Roberts M.C., Schwarz S., Cattoir V. et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020; 75(12): 3491-500.
22. Liu H., Kong W., Yang W., Chen G., Liang H., Zhang Y. Multilocus sequence typing and variations in the *oprD* gene of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a hospital in China. *Infect. Drug. Resist.* 2018; 11: 45-54.
23. Fan X., Wu Y., Xiao M., Xu Z.P., Kudinha T., Bazaj A. et al. Diverse genetic background of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Mainland China, and emergence of an extensively drug-resistant ST292 clone in Kunming. *Sci. Rep.* 2016; 6: 26522.
24. de Oliveira F.P., Pires B.M.F.B., de Cassia Ferreira de Almeida Silva K., de Carvalho B.T.F., Teixeira L.A., de Paula G.R. et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and clonal diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic wounds. *J. Wound. Ostomy. Continence Nurs.* 2017; 44(6): 528-35.
25. Rodrigues Y.C., Furlaneto I.P., Maciel A.H.P., Quaresma A.J.P.G., de Matos E.C.O., Conceicao M.L. et al. High prevalence of atypical virulotype and genetically diverse background among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a referral hospital in the Brazilian Amazon. *PLoS One.* 2020; 15(9): e0238741.
26. Siyanova E.A., Chernukha M.Y., Avetisyan L.R., Shaginyan I.A., Prilipov A.G., Usachev E.V. et al. Monitoring of chronic lung infection in patients with cystic fibrosis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Pediatriya.* 2018; 97(2): 77-86. (in Russian)
27. Rossi E., La Rosa R., Bartell J.A., Marvig R.L., Haagensen J.A.J., Sommer L.M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021; 19(5): 331-42.
28. Schick A., Kassen R. Rapid diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung-like conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018; 115(42):10714-19.
29. Dettman J.R., Kassen R. Evolutionary genomics of niche-specific adaptation to the cystic fibrosis lung in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(2): 663-75.
30. Winstanley C., O'Brien S., Brockhurst M.A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol.* 2016; 24(5): 327-37.
31. Mustafa M.H., Chalhoub H., Denis O., Deplano A., Vergison A., Rodriguez-Villalobos H. et al. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Northern Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60(11): 6735-41.

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© ПЕТРАШОВА Д.А., КОЛОМЕЙЧУК С.Н., 2021

Петрашова Д.А.¹ Коломейчук С.Н.^{2,3}

ПОЛИМОРФНЫЙ ВАРИАНТ *IN/DEL* ГЕНА АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА (АПФ) И ДЕСТАБИЛИЗАЦИЯ ГЕНОМА У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА КРАЙНЕМ СЕВЕРЕ

¹ФИЦ Кольский научный центр РАН, 184209, Апатиты, Россия;

²ФИЦ Карельский научный центр РАН, 185910, Петрозаводск, Россия;

³ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет», 163000, Архангельск, Россия

В последние годы отмечается значительный рост диагностирования артериальной гипертензии среди детей и подростков. Особенно риску возникновения данной патологии подвержены дети, проживающие в условиях Крайнего Севера. Существует потребность в недорогой, неинвазивной и простой диагностике риска возникновения патологий в детском возрасте. Ранее было установлено, что генотип DD полиморфного маркера in/del гена АПФ обнаруживается у людей, попадающих в группу риска развития сердечно-сосудистых патологий. В работе применили микроядерный тест на клетках буккального эпителия и генетический анализ. Всего были обследованы 77 школьников из города Апатиты, в возрасте 15-17 лет. Нами показано, что у носителей аллеля D отмечена тенденция к повышению частоты клеток с микроядрами. При гомозиготном варианте I/I частота встречаемости клеток с кариопикнозом достоверно выше, чем у носителей аллеля D. Полиморфный маркер in/del гена АПФ ассоциирован с апоптотическими изменениями в клетках исследуемых детей. Полиморфный маркер in/del гена АПФ можно использовать как прогностический маркер процессов дестабилизации генома на ранних стадиях развития организма человека.

Ключевые слова: генетический полиморфизм; буккальный эпителий; микроядерный тест; ангиотензинпревращающий фермент; высокие широты, Арктика.

Для цитирования: Петрашова Д.А., Коломейчук С.Н. Полиморфный вариант *in/del* гена ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) и дестабилизация генома у детей, проживающих на Крайнем Севере. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66 (10): 635-640. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-635-640>

Для корреспонденции: Петрашова Дина Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., и.о. зав. лаб. мед. и биол. технологий; e-mail: dinapetrashova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование было поддержано бюджетными темами 0186-2019-0009 и 0218-2019-0077.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность ст. научному сотруднику, канд. биол. наук В.В. Пожарской и мл. научному сотруднику Т.С. Новиковой за помощь в организации исследования и взятие образцов буккального эпителия у школьников.

Поступила 27.05.2021

Принята к печати 25.06.2021

Petrashova D.A.¹, Kolomeichuk S.N.^{2,3}

EFFECT OF ANGIOTENSIN-I CONVERTING ENZYME GENE INSERTION/DELETION POLYMORPHISM ON GENOME INSTABILITY IN CHILDREN LIVING IN RUSSIAN ARCTIC

¹Kola Science Centre, Russian Academy of Sciences, Apatity, 184209, Russia;

²Karelian Science Center, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, 185910, Russia;

³North State Medical University, 163000, Arhangelsk, Russia

Main risks of arterial hypertension manifest in childhood. Children living in the Far North are especially susceptible to this. There is a need for an inexpensive, non-invasive and simple diagnosis of the risk of childhood pathologies. It was previously found that the genotype DD of the in/del polymorphic marker of the ACE gene is found in people at risk of developing cardiovascular pathologies. Buccal micronucleus cytome assay and genetic analysis were used in the work. In total, 77 schoolchildren from the city of Apatity, aged 15-17 years old, were examined. We have shown that carriers of the D allele have a tendency to an increase in the frequency of cells with micronuclei. In the case of homozygous I/I variant, the frequency of occurrence of cells with karyopycnosis is significantly higher than in carriers of allele D. Polymorphic marker in/del of the ACE gene is associated with apoptotic changes in the cells of the studied children. The in/del polymorphic marker of the ACE gene can be used as a prognostic marker of the processes of genome destabilization at the early stages of development of the human body.

Key words: genetic polymorphism; angiotensin converting enzyme; micronucleus; buccal cells; Buccal micronucleus cytome assay; high latitude; Arctic.

For citation: Petrashova D.A., Kolomeichuk S.N. Effect of Angiotensin-I Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism on genome instability in children living in Russian Arctic. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (10): 635-640 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-635-640>

For correspondence: Petrashova Dina Alexandrovna; e-mail: dinapetrashova@mail.ru

Information about authors:

Petrashova D.A., <https://orcid.org/0000-0003-3997-637X>;
Kolomeichuk S.N., <https://orcid.org/0000-0003-3104-3639>.

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

Acknowledgment. The study supported by government budgetary orders № 0186-2019-0009 and № 0218-2019-0077.

Received 27.05.2021
Accepted 27.06.2021

Введение. Климатические условия Арктики, связанные с аномальными сезонными колебаниями температуры и освещенности, негативно влияют на здоровье человека. Системный анализ, проведенный В.П. Казначеевым и соавт. [1], выявил комплекс изменений, которые возникают у населения на Крайнем Севере в виде синдрома «полярного напряжения». Этот синдром является специфической формой хронического психоэмоционального стресса, важными проявлениями которого являются сердечно-сосудистые заболевания. В литературе имеются сведения, что ранние проявления данной патологии выявлены и в детском возрасте [2]. Следует отметить, что своевременная диагностика факторов риска и эффективное лечение в сочетании с массовой профилактикой образа жизни могут дать максимальный эффект. В ходе эпидемиологических многоцентровых исследований установлено, что в регионах России частота первичной артериальной гипертензии (АГ) у детей и подростков имеет существенные отличия и составляет от 1 до 18% [3, 4]. Это связано как с различием возрастных групп обследуемых, так и с особенностями территорий проживания (климат, антропогенное загрязнение, социально-экономическая составляющая). В целом, вопрос эпидемиологии АГ у детей малоизучен, в особенности с учетом влияния условий окружающей среды и социальных факторов. Данный аспект определяет актуальность проблемы для современной педиатрии. Существует острая необходимость в неинвазивной и доступной диагностике риска возникновения и развития патологий у детей. Данные по частоте встречаемости клеток с микроядрами и апоптотическими процессами могут применяться в качестве интегрального индикатора негативных процессов в организме. Микроядерный тест обладает высоким уровнем репрезентативности и успешно применяется в клинической практике для диагностики и прогноза течения ряда заболеваний [5].

Целью нашей работы являлась оценка уровня цитогенетических нарушений в клетках буккального эпителия у носителей разных вариантов полиморфного маркера гена АПФ в группе детей старшего школьного возраста, проживающих в высоких широтах. Выбор детей старшего школьного возраста для исследования обусловлен высокой чувствительностью к генотоксическим агентам [6] и простотой анкетных опросов по сравнению с другими возрастными группами.

Материал и методы. Обследование проведено в соответствии с принципами Хельсинской декларации об этических принципах медицинских исследований. Комитет по этике при Минздраве Республики Карелия одобрил протокол данного исследования (протокол № 41 от 06.09.2018 г.). Исходная выборка включала в себя 126 школьников в возрасте 15-17 лет. В исследовании в итоге приняли участие 77 школьников, проживающих в

городе Апатиты Мурманской области (коэффициент ответа – 61,1%). Родители или опекуны школьников были заранее ознакомлены с методами исследования и подписали информированное согласие.

На первом этапе работ мы проводили анкетирование по специальному опроснику [7]. Критерии исключения: злокачественные образования в анамнезе, наличие хронических заболеваний легких, диабет и ожирение, курение, употребление алкоголя, употребление витаминов в течение месяца, простудные заболевания в течение месяца, прохождение рентгенологических исследований в течение полугода, высокий уровень тревожности.

Молекулярно-генетическая диагностика полиморфизма гена АПФ проводилась методом полимеразной цепной реакции как описано ранее [8]. Образец слюны детей объемом 200 мкл использовался для выделения ДНК с помощью набора Диа_М (Россия) согласно инструкции производителя.

Микроядерный тест на буккальном эпителии проводился согласно международному протоколу [9]. Анализировалось не менее 2000 клеток для каждого образца при увеличении 1000x с использованием масляной иммерсии (AXIOSTAR PLUS, Karl Zeiss). В данном исследовании определялись следующие показатели: (а) клетки с нарушением ДНК (микроядро, ядерная почка, разбитое яйцо и прочие протрузии); (б) клетки с нарушением пролиферации (двуядерные клетки, круговая насечка); (с) показатели клеточной смерти (конденсация хроматина, карирексис, пикноз, кариолизис и клетки с апоптотическими телами).

Статистический анализ данных проводили с помощью среды R. Достоверность различий частот аллелей и генотипов в группах оценивали с помощью критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. Достоверность различий между группами с разными полиморфизмами гена АПФ определяли согласно критерию Стьюдента при нормальном распределении и критерию Манна-Уитни при распределении, отличном от нормального. Критический уровень для подтверждения нулевой гипотезы принимался в 5% ($p < 0,05$).

Результаты. Всего были обследованы 77 школьников из города Апатиты, в возрасте 15-17 лет, из них 41 девочка, 36 мальчиков. Основные показатели исследуемой выборки представлены в табл. 1. Половой состав выборки соответствовал половозрастной структуре населения Мурманской области [10].

В нашем исследовании частоты клеток с микроядрами достоверно не различались для изучаемых генотипов и не превышали показатели среднепопуляционной нормы в 2-4% [11].

Для исследования роли In/Del полиморфизма гена АПФ в развитии и прогрессировании нестабильности генома у детей Мурманской области мы определили генотип АПФ методом ПЦР-ПДРФ [12]. Распределение

Характеристика исследуемой выборки

Параметр	Результат
Пол, мужской/женский, (%)	34 / 43 (44,1 % / 55,9 %)
ИМТ, кг/м ²	20,85
Физическая активность	
Да	44 (42,7 %)
Нет	59 (56,4%)
Употребление алкоголя, <i>n</i> (%)	
Регулярное (каждую неделю)	19(10,2%)
Не употребляю	166(89,8%)
Курение, <i>n</i> (%)	
Курю	110 (18,3%)
Не курю	491(81,7%)

аллелей и генотипов полиморфного маркера In/Del гена АПФ подчинялось закону Харди-Вайнберга ($\chi^2=0,77$; $p=0,82$) и не отличалось от ранее описанного для выборки детей Северо-Запада [13].

Анализ частоты встречаемости цитогенетических нарушений при различных вариантах полиморфного маркера I/D гена АПФ показал при генотипе D/D достоверно более низкие показатели частоты встречаемости двуядерных клеток и клеток с протрузиями по типу разбитое яйцо и прочими протрузиями ядра. При этом у носителей генотипа D/D частота клеток с круговой насечкой выше, чем у носителей других генотипов. Наблюдается тенденция по увеличению частоты встречаемости клеток с микроядрами у носителей D аллеля, однако, различия из-за малой выборки не достоверны. При гетерозиготном варианте I/D частота встречаемости клеток с ядерными почками достоверно ниже, а с кариорексисом достоверно выше, чем при гомозиготных вариантах I/I и D/D. При гомозиготном варианте I/I частота встречаемости клеток с кариопикнозом достоверно выше, чем у носителей аллеля D (табл. 2).

Корреляционный анализ цитогенетических нарушений показал, что при всех трех генотипах частота встречаемости клеток с ядерными почками достоверно связана с возрастанием частоты встречаемости клеток с кариолизисом ($r_{I/I}=0,64$, $p=0,013$; $r_{I/D}=0,34$, $p=0,029$; $r_{D/D}=0,51$, $p=0,018$). Для генотипа I/I показана достоверная положительная корреляция частоты встречаемости клеток буккального эпителия кариопикнотическими изменениями с частотами встречаемости клеток с такими нарушениями ядра как микроядра ($r=0,64$, $p=0,013$) и ядерные почки ($r=0,62$, $p=0,019$). Стоит отметить, что для гомозигот по аллелю D выявлены следующие достоверные связи с частотой встречаемости клеток с апоптозом: положительная с частотой встречаемости клеток с микроядрами ($r=0,43$, $p=0,049$) и отрицательная с частотой встречаемости клеток с ядерными почками ($r=-0,51$, $p=0,018$).

Обсуждение. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера In/Del гена АПФ соответствует данным авторов, исследовавших детское население Северо-Запада России [13]. Отмечено, что носители аллеля D характеризуются повышенным уровнем

активности АПФ в плазме крови, в сердечной мышце и в тканях, и, следовательно, им свойствен более высокий уровень ангиотензина II. Среди людей, отнесенных к группе риска развития ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, постинфарктных осложнений, инсулинорезистентности и сахарного диабета генотип DD выявлен у 28–31%. Аллель D достоверно ассоциирован с более высокой активностью белкового продукта гена ACE и проявлением силовых и координационных способностей у спортсменов [14].

Микроядра являются признанными биомаркерами генотоксического действия различных факторов. Они описаны как отдельная часть генетического материала вне основного ядра. Считается, что микроядра являются либо фрагментом хромосомы, отделившемся при ее повреждении, либо одной или несколькими целыми хромосомами, отстающими в анафазе и не включенными в основное ядро [15]. Согласно литературным данным, наиболее ранним проявлением риска развития рака полости рта является увеличение частоты клеток с микроядрами в буккальном эпителии [16]. В нашем исследовании у детей-носителей аллеля D имеется тенденция к повышению частоты встречаемости клеток буккального эпителия с микроядрами. Наши данные согласуются с результатами, полученными Ф.И. Ингель [17] от образцов школьников, проживающих в экологически неблагоприятных условиях. Автором было обнаружено снижение частоты апоптоза и повышение частоты микроядер в культивированных клетках крови детей, находящихся в состоянии эмоциональной дезадаптации.

В ряде работ показано, что у носителей генотипа D/D выявлен достоверно более высокий уровень систолического артериального давления [12, 18]. Стоит отметить экспериментальные данные о том, что носительство генотипа D/D может повышать риск гипертрофии левого желудочка после инфаркта миокарда [13, 18], а также частоту хронической сердечной недостаточности у пациентов с ИБС. К.И. Губаев и соавт. [19] показали, что генотип DD можно использовать как маркер ухудшения сердечной функции. Следовательно, гомозиготы по аллелю D – это люди с риском инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца и именно у них нарушены процессы репарации, увеличивающие количество ядерных почек.

Частота встречаемости цитогенетических нарушений в клетках буккального эпителия при различных полиморфных вариантах гена АПФ

Показатели	I/I	I/D	D/D
<i>n</i>	14	42	21
Цитогенетические нарушения, ‰			
Частота клеток с микроядрами, W	2,3±0,39	2,8±0,3	2,8±0,42
Частота клеток с ядерными почками, t	1,8±0,85 ^{I/D}	0,5±0,15 ^{I/I, D/D}	1,6±0,96 ^{I/D}
Частота клеток с протрузией «разбитое яйцо», t	0,7±0,2 ^{D/D}	0,7±0,15 ^{D/D}	0,6±0,2 ^{I/I, I/D}
Частота клеток с прочими протрузиями, t	0,9±0,32 ^{I/D, D/D}	1,0±0,16 ^{I/I, D/D}	0,6±0,24 ^{I/I, I/D}
Показатели пролиферации, ‰			
Частота клеток с двумя ядрами, W	1,8±0,34	2,1±0,38	1,3±0,43
Частота клеток с круговой насечкой, t	0,4±0,17 ^{D/D}	0,4±0,09 ^{D/D}	0,6±0,17 ^{I/I, I/D}
Стадии деструкции ядра, ‰			
Частота клеток с конденсацией хроматина, W	3,3±0,66	4,7±0,48	4,3±0,55
Частота клеток с кариолизисом, W	58,5±3,31	59,2±2,06	56,9±3,06
Частота клеток с кариорексисом, t	0,1±0,04 ^{I/D}	0,2±0,03 ^{I/I, D/D}	0,1±0,04 ^{I/D}
Частота клеток с кариопикнозом, t	0,4±0,16 ^{I/D, D/D}	0,3±0,04 ^{I/I}	0,3±0,07 ^{I/I}
Частота клеток с апоптозными телами, W	4,6±0,92	3,9±0,4	4,1±0,63

Примечание. I/I, I/D, D/D (обозначенные верхним регистром) указывают, с каким вариантом генотипа имеются статистически достоверные различия ($p < 0,05$); t – достоверность различий между группами определялась с помощью критерия Стьюдента; W – достоверность различий между группами определялась с помощью критерия Манна-Уитни.

Ядерная почка и «разбитое яйцо» – важные митогенетические нарушения при проведении микроядерного теста. На данный момент, общепризнанного механизма появления данного вида протрузий пока нет. Существует точка зрения, что протрузии являются результатом дегенеративных клеточных изменений [20]. Одни авторы считают, что эти ядерные аномалии возникают в результате воздействия генотоксических эффектов [21–23], эпигенетических процессов [24] или отделения части ядра во время S-фазы [25]. Другие исследователи рассматривают протрузии как результат цитогенетических нарушений [26–29]. В то же время предполагается, что появление ядерных почечек может быть связано с элиминацией амплифицированной ДНК и процессами репарации ДНК [20, 24, 25, 30].

М. Zakrzewski-Jakubiak с соавт. [31] было описано, что физиологические функции при сердечной недостаточности и активность ренин-ангиотензина имеют полигенную природу. Одновременное исследование нескольких генетических полиморфизмов в одной и той же популяции выявило, что только комбинации генотипов были связаны с клиническими данными и результатами эхокардиографии.

Следовательно, комплексный подход с применением набора генетических маркеров и цитогенетики будет более эффективным для выявления более тяжелых больных, чем отдельные гены-кандидаты. Продолжение данного исследования с большим количеством испытуемых является актуальным для выяснения механизмов риска сердечно-сосудистых патологий.

Заключение. Полиморфный маркер *in/del* гена АПФ ассоциирован с апоптотическими изменениями в клетках обследуемых детей. Полиморфный маркер *in/del* гена АПФ можно использовать как прогностический маркер процессов дестабилизации генома на ранних стадиях развития организма человека.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 20–28, 30, 31 см. REFERENCES)

1. Казначеев В.П., Куликов В.Ю. Синдром полярного напряжения и некоторые вопросы экологии человека в высоких широтах *Вестник АН СССР*. 1980; 1:74 – 82.
2. Сухорукова О.В. Распространенность, диагностика и профилактика артериальной гипертензии у детей школьного возраста. Смоленск: Смоленская госмедакадемия; 2008.
3. Леонтьева И.В., Агапитов Л.И. Суточное мониторирование артериального давления в дифференциальной диагностике артериальной гипертензии у подростков. *Российский кардиологический журнал*. 2000; 4(24):18–23.
4. Александров А.А., Кисляк О.А., Леонтьева ИВ, Розанов В.Б. Диагностика, лечение и профилактика артериальной гипертензии у детей и подростков. Российские рекомендации (второй пересмотр). *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2009; 8(4):253–88.
5. Таболин В.А., Ильина А.Я., Макацария А.Д., Якунина Л.Н., Анастасевич Л.А., Немировский В.Б., и др. Клиническое значение показателей гемостаза в генезе заболеваний новорожденных раннего неонатального периода, родившихся у женщин с кардиоваскулярной патологией. *Педиатрия*. 2006; 85 (1):22–6.
7. Петрашова Д.А. Цитогенетические особенности буккального эпителия у школьников старшего возраста, проживающих в высоких и средних широтах. *Клиническая лабораторная диагно-*

- стика. 2019; 4:229-33. doi: 10.18821/0869-2084-2019-64-4-229-233.
8. Коломейчук С.Н., Алексеев Р.В., Путилов А.А., Мейгал А.Ю. Ассоциация полиморфных вариантов генов ACE и BDKRB2 с параметрами вариабельности сердечного ритма у спортсменов Республики Карелии. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2017; 4:50–8. doi: 10.24075/brsmu.2017-04-08.
10. Оценка численности постоянного населения на 1 января 2020 года и в среднем за 2019 год. Росстат; 2020.
13. Образцова Г.И., Глотов А.Е., Степанова Т.В., Иващенко Т.Э., Ковалев Ю.Р. Полиморфизм генов ренин-ангиотензиновой системы и рецептора брадикинина у детей и подростков с первичной артериальной гипертензией. *Артериальная гипертензия*. 2006; 12(2):156-60.
15. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. *Медицинская генетика*. 2007; 6(11):3-12.
17. Ингель Ф.И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока: Часть 2. Факторы среды и индивидуальные особенности в системе оценки нестабильности генома человека. Дополнительные возможности теста. Методика проведения экспериментов и цитогенетического анализа. *Экологическая генетика*. 2006; 4: 38-53.
19. Губаев К.И., Насибуллин Т.Р., Закирова А.Н., Мустафина О.Е. Ассоциация полиморфных маркеров I/D гена ACE и A1166C гена AT2R1 с хронической сердечной недостаточностью ишемической этиологии в популяциях русских и татар республики Башкортостан. *Генетика*. 2006; 42:1447-51.
29. Мейер А.В., Толочко Т.А., Литвин А.В., Минина В.И., Кулемин Ю.Е. Кариологический статус буккальных эпителиоцитов шахтёров с профессиональными лёгочными патологиями. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(3):220-5. doi: 10.18821/0016-9900-2018-97-3-220-225.
- yskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2017; 4: 50–8. (in Russian)
9. Thomas P., Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M., Bonassi S., Zeiger E., et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2009; 4:825-37. doi: 10.1038/nprot.2009.53.
10. Estimated resident population as of January 1, 2020 and on average for 2019. *Rosstat*; 2020. (in Russian)
11. Tolbert P.E., Shy C.M., Allen J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears – methods development. *Mutation Research*. 1992; 271:69-77. doi: 10.1016/0165-1161(92)90033-i.
12. Rigat B., Hubert C., Alhencgas F., Cambien F., Corvol P., Soubrier F. An insertion deletion polymorphism in the angiotensin i-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *Journal of Clinical Investigation*. 1990; 86:1343-6. doi: 10.1172/JCI114844.
13. Obraztsova G.I., Glotov A.E., Stepanova T.V., Ivashchenko T.Ye., Kovalev Yu.R. Polymorphism of the genes of the renin-angiotensin system and the bradykinin receptor in children and adolescents with primary arterial hypertension. *Arterial'naya gipertenziya*. 2006; 12(2):156-60. (in Russian)
14. Dias R.G., Gowdak M.M., Pereira A.C. Genetics and cardiovascular system: influence of human genetic variants on vascular function. *Genes and Nutrition*. 2011; 6:55-62. doi: 10.1007/s12263-010-0193-7.
15. Sycheva L.P. Biological value, scoring criteria and limits of a variation of a full spectrum karyological indexes of exfoliated cells for estimation of human cytogenetic status. *Meditsinskaya genetika*. 2007; 6(11):3-12. (in Russian)
16. Cardoso R.S., Takahashi-Hyodo S., Peitl P., Ghilardi-Neto T., Sakamoto-Hojo E.T. Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. 2001; 21:431-9. doi: 10.1002/tcm.1030.
17. Ingel F.I. Prospects for the use of the micronucleus test on human lymphocytes cultured under the conditions of the cytokinetic block: Part 2. Environmental factors and individual characteristics in the system for assessing the instability of the human genome. Additional test capabilities. Experimental technique and cytogenetic analysis. *Ekologicheskaya genetika*. 2006; 4: 38-53. (in Russian)
18. Karaali Z.E., Agachan B., Yilmaz H., Isbir T. Angiotensin-converting enzyme I/D gene polymorphisms and effects of left ventricular hypertrophy in Turkish myocardial infarction patients. *Acta Cardiologica*. 2004; 59:493-7. doi: 10.2143/AC.59.5.2005221.
19. Gubaev K.I., Nasibullin T.R., Zakirova A.N., Mustafina O.E. Association of polymorphic markers I/D of gene ACE and A1166C of gene AT2R1 with ischemic chronic heart failure in the Russian and tatar populations of Bashkortostan Republic. *Genetika*. 2006; 42:1447-51. (in Russian)
20. Nersesyan A.K. Nuclear buds in exfoliated human cells. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2005; 588:64-8. doi: 10.1016/j.mrgentox.2005.06.010.
21. Serrano-Garcia L., Montero-Montoya R. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2001; 38:38-45. doi: 10.1002/em.1048.
22. Montero R., Serrano L., Davila V., Segura Y., Arrieta A., Fuentes R., et al. Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2003; 42:216-22. doi: 10.1002/em.10186.
23. Zeljezic D., Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicology*. 2004; 200:39-47. doi: 10.1016/j.tox.2004.03.002.
24. Fenech M., Crott J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research-Fundamental and Molecular*

REFERENCES

1. Kaznacheev V.P., Kulikov V.Yu. Polar stress syndrome and some issues of human ecology in high latitudes. *Vestnik AN USSR*. 1980; 1:74 – 82. (in Russian)
2. Sukhorukova O.V. Prevalence, diagnosis and prevention of arterial hypertension in school-age children. Smolensk: Smolenskaya gosudarstvennaya meditsinskaya akademiya; 2008. (in Russian)
3. Leont'eva I.V., Agapitov L.I. 24-hour monitoring of blood pressure in the differential diagnosis of arterial hypertension in adolescents. *Rossiyskiy kardiologicheskij zhurnal*. 2000; 4(24):18-23. (in Russian)
4. Aleksandrov A.A., Kisljak O.A., Leont'eva I.V., Rozanov V.B. Diagnostics, treatment and prevention of arterial hypertension in children and adolescents. Russian recommendations (second revision). *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2009; 8(4). (in Russian)
5. Tabolin V.A., Il'ina A.Ja., Makacarija A.D., Jakunina L.N., Anastasevich L.A., Nemirovskij V.B. et al. Clinical significance of hemostasis indicators in the genesis of diseases of newborns of the early neonatal period born to women with cardiovascular pathology. *Pediatriya*. 2006; 85 (1):22-6. (in Russian)
6. Neri M., Ceppi M., Knudsen L.E., Merlo D.F., Barale R., Puntoni R., et al. Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses. *Health Perspectives*. 2005; 113:1226-9.
7. Petrashova D.A. Buccal epithelium cytogenetic status in schoolchildren living in high and middle latitudes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 4: 229-33. (in Russian)
8. Kolomeychuk S.N., Alekseev R.V., Putilov A.A., Meigal A.Yu. Association of polymorphic variants of ACE and BDKRB2 with heart rate variability in athletes of the Republic of Karelia. *Vestnik Rossi-*

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Mechanisms of Mutagenesis*. 2002; 504:131-6. doi: 10.1016/s0027-5107(02)00086-6.
25. Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology*. 1998; 140:1307-20. doi: 10.1083/jcb.140.6.1307.
 26. Gadhia P.K., Thumbar R.P., Kevadiya B. Cytome Assay of Buccal Epithelium for Bio-monitoring Genotoxic Assessment of Benzene Exposure among Petrol Pump Attendants. *International Journal of Human Genetics*. 2010; 10:239-45. doi: 10.1080/09723757.2010.11886112.
 27. Celik A., Yildirim S., Ekinci S.Y., Tasdelen B. Bio-monitoring for the genotoxic assessment in road construction workers as determined by the buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013; 92:265-70. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.01.030.
 28. Benedetti D., Nunes E., Sarmiento M., Porto C., dos Santos C.E.I., Dias J.F., et al. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013; 752:28-33. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.01.001.
 29. Meyer A.V., Tolochko T.A., Litvin A.V., Minina V.I., Kulemin Y.E. Karyological status of buccal epithelial cells of miners with occupational lung pathologies. *Gigiena i Sanitariya*. 2018; 97(3): 220-5. (in Russian)
 30. Shimizu N., Kamezaki F., Shigematsu S. Tracking of microinjected DNA in live cells reveals the intracellular behavior and elimination of extrachromosomal genetic material. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33:6296-307. doi: 10.1093/nar/gki946.
 31. Zakrzewski-Jakubiak M, de Denus S, Dube MP, Belanger F, White M, Turgeon J. Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2008; 65:742-51. doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.03091.x.