

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 67
7 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

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

ИЮЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

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

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор
Е.М. Архилова

Сдано в набор 25.04.2022.
Подписано в печать 20.05.2022.
Формат 60 × 88%.
Печать офсетная.
Печ. л. 8,00
Уч.-изд. л. 9,87.

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 Micrology, 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.
2022. № 7. 365–428.

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,
Л.М. СКУИНЬ, 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*), 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 67
7 • 2022

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

JULY

The Journal is founded in 1955.

Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

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

Managing editor L.A. Shankina

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

The Journal is presented in data base of the Russian index of scientific quotation (RiNZ) and in following I&R editions: Abstracts of Micology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV EM-BASE, Elsevier BV Scopus, Excerpta Medica, Abstract Journals, Index Medicus, Index to Dental Literature, National Library of Medicine PubMed, OCLC Article First, OCLC MEDLINE, Reactions Weekly (Print), Thomson Reuters Biological 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, 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. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MAVZYTTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), 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. TARTAKOVSKYI (*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*), A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

Мыльников П.Ю., Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Якушева Е.Н.

Разработка и валидация методики количественного определения малонового диальдегида методом ВЭЖХ-МС/МС. 369

Даренская М.А., Ступин Д.А., Семендяев А.А., Колесников С.И., Гребенкина Л.А., Щербатых А.В., Толкачев К.С., Колесникова Л.И.

Сравнительный анализ липопероксидации в периферическом и регионарном кровотоках у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза. 374

Потеряева О.Н., Усынин И.Ф.

Липопротеины высокой плотности: от количественных показателей к функциональной оценке и терапии (обзор литературы) 381

ИММУНОЛОГИЯ

Луговая А.В., Эмануэль Т.С., Калинина Н.М., Митрейкин В.Ф., Артемова А.В., Макиенко А.А.

Роль аутофагии в регуляции нейровоспаления при остром ишемическом инсульте (обзор литературы) 391

МИКРОБИОЛОГИЯ

Багирова Н.С., Петухова И.Н., Григорьевская З.В.

Кандидемия у онкологических больных: особенности таксономической структуры. 399

Чеснокова М.Г., Чесноков В.А., Миронов А.Ю., Блесман А.И., Полонянкин Д.А.

Анализ микрорельефа биоплёнки грибов *Candida albicans* базисных пластмасс методом лазерной модуляционной интерференционной микроскопии. 407

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

Матосова Е.В., Андрюков Б.Г., Бынина М.П., Дробот Е.И., Ляпун И.Н.

Биобезопасность персонала микробиологических лабораторий в контексте Федерального закона РФ № 492-ФЗ от 30.12.2020 г. «О биологической безопасности Российской Федерации». 414

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кошечкин С.И., Шевченко Г.В., Марданлы С.Г., Дёмкин В.В.

Выявление маркера Y-хромосомы в плазме беременных женщин методом ПЦР в реальном времени: диагностическая точность на разных сроках беременности 423

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Mylnikov P.Yu., Shchulkin A.V., Abalenikhina Yu.V., Yakusheva E.N.*
Development and validation of a methodology for quantitative determination of malondialdehyde
by HPLC-MC/MS 369
- Darenskaya M.A., Stupin D.A., Semendyaev A.A., Kolesnikov S.I., Grebenkina L.A., Shcherbatykh A.V.,
Tolkachev K.S., Kolesnikova L.I.*
Peripheral and regional blood bloodstreams lipid peroxidation comparative analysis in women
with pelvic venous disorder 374
- Poteryaeva O.N., Usynin I.F.*
High-density lipoproteins: from quantitative measures to functional assessment and therapy
(review of literature) 381

IMMUNOLOGY

- Lugovaya A.V., Emanuel T.S., Kalinina N.M., Mitreikin V. Ph., Artemova A.V., Makienko A.A.*
The role of autophagy in the regulation of neuroinflammation in acute ischemic stroke (review of literature) ... 391

MICROBIOLOGY

- Bagirova N.S., Petukhova I.N., Grigorievskaya Z.V.*
Candidemia in cancer patients: features of the taxonomic structure 399
- Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A.Yu., Blesman A.I., Polonyankin D.A.*
Analysis of micro-relief of biofilm of yeast *Candida albicans* of basic plastics by the method
of laser modulation interference microscopy 407

LABORATORY SERVICE ORGANIZATION

- Matosova E.V., Andryukov B.G., Bynina M.P., Drobot E.I., Lyapun I.N.*
Biosafety of personnel of microbiological laboratories in the context
of the Federal Law of the Russian Federation № 492-FZ of December 30, 2020
«On the biological safety of the Russian Federation» 414

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Koshechkin S.I., Shevchenko G.V., Mardanly S.G., Demkin V.V.*
Detection of Y-chromosome marker in plasma of pregnant women using real time PCR:
diagnostic accuracy depending on gestation age 423

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Мыльников П.Ю., Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Якушева Е.Н.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 390026 г. Рязань, Россия

Разработана и валидирована биоаналитическая методика количественного определения малонового диальдегида (МДА) методом ВЭЖХ-МС/МС. Предложенный метод определения МДА включает стадию высвобождения связанного МДА без реакции дериватизации. Нижний предел количественного обнаружения составил 600 нмоль/л, объем необходимой пробы 10 мкл, время анализа 7 мин. Полученный в ходе исследования диапазон концентраций дает возможность использовать данную биоаналитическую методику для определения концентрации МДА в биологическом материале при оценке физиологических и патологических состояний.

Ключевые слова: малоновый диальдегид; ВЭЖХ-МС/МС; окислительный стресс.

Для цитирования: Мыльников П.Ю., Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Якушева Е.Н. Разработка и валидация методики количественного определения малонового диальдегида методом ВЭЖХ-МС/МС. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (7): 369-373. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-369-373>

Для корреспонденции: Абаленихина Юлия Владимировна, канд. биол. наук, доц. каф. биологической химии с курсом клин. лаб. диагностики; e-mail: abalnihina88@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 24.02.2022

Принята к печати 10.03.2022

Опубликовано 18.07.2022

Mylnikov P.Yu., Shchulkin A.V., Abalenikhina Yu.V., Yakusheva E.N.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHODOLOGY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF MALONDIALDEHYDE BY HPLC-MS/MS

Ryazan State Medical University, 390026 Ryazan', Russian Federation

A bioanalytical technique for quantitative determination of MDA by HPLC-MS/MS. The proposed method for determining MDA includes the release stage of bound MDA and excludes the derivatization reaction. The lower limit of quantitative detection was 600 nmol/l, the volume of the required sample was 10 µl, the analysis time was 7 min. The range of concentrations obtained during the study makes it possible to use this bioanalytical technique to determine the concentration of MDA in biological material when assessing physiological and pathological conditions.

Key words: malondialdehyde; HPLC-MS/MS; oxidative stress.

For citation: Mylnikov P.Yu., Shchulkin A.V., Abalenikhina Yu.V., Yakusheva E.N. Development and validation of a methodology for quantitative determination of malondialdehyde by HPLC-MS/MS. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (7): 369-373 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-369-373>

For correspondence: Abalenikhina Yuliya Vladimirovna, PhD. Biol. sciences, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry with a course of clinical laboratory diagnostics; e-mail: abalnihina88@mail.ru

Information about authors:

Mylnikov P.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-7829-2494>;

Shchulkin A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>;

Abalenikhina Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-0427-0967>;

Yakusheva E.N., <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 24.02.2022

Accepted 10.03.2022

Published 18.07.2022

Введение. Окислительный стресс – это типовой патологический процесс, который характеризуется дисбалансом между активными формами кислорода (АФК) и емкостью антиоксидантных систем. В ходе ОС происходит генерация АФК, которые взаимодействуют с раз-

ными классами макромолекул: липиды, белки и нуклеиновые кислоты [1].

Самым активным процессом является перекисное окисление липидов (ПОЛ) – реакция кислорода с ненасыщенными жирными кислотами, в результате которой

образуется широкий спектр продуктов окисления. Малоновый диальдегид (МДА) является одним из наиболее известных продуктов ПОЛ [2].

Известно, что в небольших концентрациях (5-10 мкМ) МДА проявляет свойства сигнальной молекулы, запуская экспрессию генов коллагена, белков Sp1 и Sp3 [3], регулирует секрецию инсулина, повышает соотношение АТФ/АДФ и уровень цитозольного Ca²⁺ [4]. Однако более высокие его концентрации являются токсичными и определяются при патологических состояниях: атеросклероз [5], диабет [6], преэклампсия [7], лимфедема нижних конечностей [8], эндотелиальная дисфункция [9]. МДА является химически стабильным веществом и обладает высокой биодоступностью, что позволяет определять его в плазме, моче, тканях, клетках и использовать в качестве маркера ОС при различных патологических состояниях.

Наиболее распространенным методом количественного определения МДА является фотометрический анализ, в основе которого лежит его способность реагировать с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) и образовывать окрашенный аддукт (МДА-(ТБК)₂) [10].

Реакция с ТБК является удобным и простым методом, однако она имеет невысокую специфичность к МДА и требует большого объема пробы, что затрудняет клинический анализ. ТБК может вступать в реакции с широким спектром компонентов, присутствующих в плазме, таких, как альдегиды, сахара и мочевины [11].

За последнее десятилетие было разработано несколько технологий определения МДА, таких как газовая хроматографическая масс-спектрометрия (GC-MS/MS), жидкостная хроматографическая масс-спектрометрия (LC-MS/MS) [12]. Все эти методы требуют предварительной дериватизации (ТБК [13], 2,4-динитрофенилгидразин [14], пентафторбензилбромид в водном ацетоне [15], пентафторбензил [15, 16]) и не учитывают стадию высвобождения МДА из связанного состояния, на долю которого приходится до 90% [17].

Таким образом, не вызывает сомнения, что количественное определение МДА имеет важное биологическое и клиническое значение, однако способ оценки требует оптимизации.

Цель работы – разработать и валидировать методику количественного определения МДА методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материал и методы. Для исследования была использована субстанция МДА в виде тетрабутиламмониевой соли («Sigma Aldrich», Германия). Для приготовления хроматографической подвижной фазы были использованы ацетонитрил специальный для градиентной хроматографии («Panreac», Испания), вода ультрачистая класса 1, полученная на деионизаторе Millipore («Sim-

plicity Water purification system и формиат аммония) («Sigma Aldrich», Германия).

Методика разработана с использованием хроматографической системы «Dionex Ultimate 3000» («ThermoFisher Scientific», США), включающей в себя градиентный насос, оснащенный системой дегазации; автосемплером, колоночным термостатом. В качестве детектора в данную систему включен tandemный масс-селективный детектор TSQ Fortis («ThermoFisher», США). Управление аналитической системой, запись показаний детектора и контроль инструментальных параметров осуществлялся с помощью модулей программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur» (ver. 4.2.47).

Хроматографию проводили на колонке UCT Selectra C18 4,6 mm×100 mm, 3µm, 100Å в комплексе с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-3UM; температура колонки 35°C. Был использован изократический режим элюирования со скоростью потока 300 мкл/мин подвижной фазой, состоящей из 20% ацетонитрила и 80% водного раствора формиата аммония с концентрацией 10 мМоль/л.

Детектирование МДА проводили при следующих условиях. Осуществлялась ионизация путём формирования электроспрея в негативном режиме при атмосферном давлении. Использовались указанные далее условия источника ионов: напряжение электроспрея 2700 В, оболочечный газ (sheath gas) 50 отн. единиц (arb), вспомогательный газ (aux gas) 10 отн. единиц (arb), продувочный газ (sweep gas) 1 отн. единица (arb), температура испарителя 350 °С, ион-транспортующей трубки 300 °С. Для детектирования был использован режим SRM со следующими параметрами: разрешение Q1 и Q3 установлено на 0,7, скорость подачи аргона (CID gas) 1 мТорр. Определяемые переходы и дополнительные параметры представлены в табл. 1. Для количественного определения использовался переход m/z 71.1 Да → 41 Да.

Объём вводимой пробы 5 мкл, время удерживания при указанных условиях составило 3,05 мин. Общее время анализа равно 7 мин.

Пробоподготовка. В качестве матрицы использовали раствор Хэнкса после инкубирования с клетками линии Caco-2 в течение 3 часов. Выбор матрицы обусловлен схожестью состава ионов и эндогенных веществ, в основном обуславливающих развитие матричного эффекта, с биологическими жидкостями при отсутствии содержания МДА.

С целью подготовки проб к хроматографированию проводилось осаждение белков путём смешивания 10 мкл пробы с 90 мкл ацетонитрила, последующим встряхиванием и дальнейшим центрифугированием при 10000g в течение 10 мин при температуре +4 °С. Полученный супернатант переносили в вials («ThermoFisher», США) со специальными вставками объёмом 300 мкл, после чего пробы помещали в автосемплер с поддерживаемой температурой +6 °С.

Приготовление сток-раствора (матричного раствора) и калибровочных растворов. 1 мг тетрабутиламмониевой соли МДА растворяли в 1 мл метанола для получения раствора 1 мг/мл, после чего 100 мкл раствора разбавляли с 900 мкл воды деионизированной для получения концентрации 100 мкг/мл (стандартный раствор), что эквивалентно 320 мкМ малонового диальдегида в растворе. Из него готовили калибровочные растворы. Матричный и стандартный растворы хранили при температуре -80°C.

Таблица 1

Условия определения переходов прекурсор-продукт малонового диальдегида

Прекурсор, m/z	Продукт, m/z	Энергия столкновения, V	Фрагментация источника, V	Напряжение линз, V
71.1	41	27	10	35
71.1	43	9	10	35
71.1	53.2	6	10	35

Таблица 2

Отклонения концентраций малонового диальдегида в калибровочных образцах от их номинальных значений

Концентрация номинальная, нмоль/л	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %
600	592	1,33	556	7,33	675	12,50
1000	1035	3,50	1069	6,90	1092	9,20
2000	1881	5,95	1830	8,50	1651	17,45
6000	6578	9,63	6570	9,50	5694	5,10
10000	9262	7,38	10214	2,14	9666	3,34
16000	16250	1,56	16385	2,41	16059	0,37
20000	20002	0,01	18976	5,12	20762	3,81

Таблица 3

Точность и прецизионность методик количественного определения малонового диальдегида в транспортной среде внутри аналитического цикла

Концентрация номинальная, нмоль/л	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %	Средняя концентрация, нмоль/л	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
600	713	18,83	654	9,00	63,98	9,78
	717	19,50				
	663	10,50				
	600	0,00				
	577	3,83				
2000	2067	3,35	2071	3,53	171,86	8,29
	2209	10,45				
	1834	8,30				
	2259	12,95				
16000	1984	0,80	16236	1,47	599,88	3,69
	15655	2,16				
	17197	7,48				
	16392	2,45				
	16040	0,25				
	15896	0,65				

В работе были использованы калибровочные стандарты концентраций 600, 1000, 2000, 6000, 10000, 16000 и 20000 нмоль/л.

Приготовление калибровочных стандартов осуществлялось путём последовательного разбавления стандартного раствора матрицей. Концентрация аналита определялась по методу абсолютной градуировки.

Валидация. Биоаналитическая методика была валидирована по параметрам [18-20]:

- селективность;
- линейность;
- нижний предел количественного определения;
- точность (внутрицикловая и межцикловая);
- прецизионность;
- перенос пробы;
- стабильность образцов;
- матричный эффект.

Результаты. Селективность. Анализ пробы транспортной среды без добавления раствора МДА показал отсутствие хроматографических пиков на времени удерживания, соответствующем аналиту.

Предел обнаружения. По данной методике пределом обнаружения является концентрация малонового диальдегида 200 нмоль/л, при этом отношение сигнала к шуму составляет не менее 3.

Нижний предел количественного определения (НПКО). В описанных ранее условиях хроматографирования и детектирования уровень НПКО составляет 600 нмоль/л. При данной концентрации на хроматограмме отношение сигнала к шуму больше 10, а точность и прецизионность ниже 20%, что соответствует современным требованиям.

Калибровочная кривая. Анализировали 7 образцов холостой транспортной среды с добавлением матричного раствора малонового диальдегида до получения растворов с концентрацией 600, 1000, 2000, 6000, 10000, 16000 и 20000 нмоль/л. Полученные с данных растворов хроматограммы были использованы для построения калибровочных графиков зависимости концентрации МДА от площади пика. В результате было получено 3 уравнения линейной регрессии:

$$Y = -17,1959 + 31,9356 * X, R^2 = 0,9971;$$

$$Y = -17,0241 + 33,4093 * X, R^2 = 0,9966;$$

$$Y = -19,429 + 32,6500 * X, R^2 = 0,9968.$$

Для построения графиков принималось значение веса концентраций 1/X для более точного построения кривой в области низких концентраций в выбранном аналитическом диапазоне. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных растворов от номинального значения приведены в табл. 2.

Точность и прецизионность. Для оценки данных параметров выполняли анализ образцов холостой транспортной среды с добавлением МДА до концентраций 600, 2000 и 16000 нмоль/л. Анализ проводили в трёх

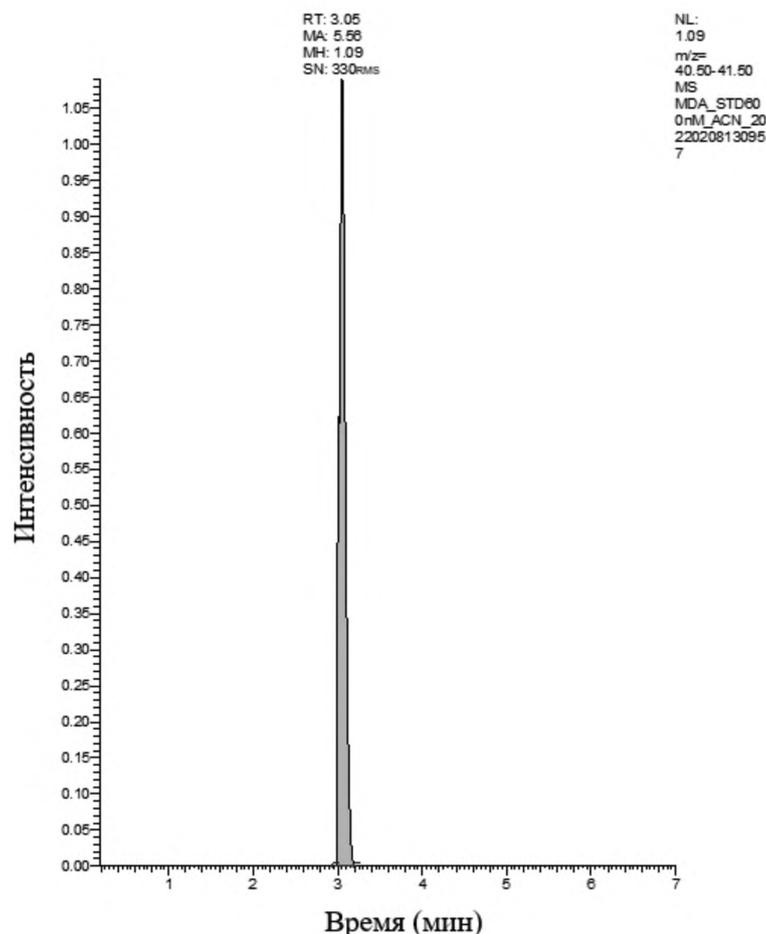
циклах, в ходе первого из которых определяли внутрицикловую точность и воспроизводимость, а в рамках второго и третьего – межцикловую. Для определения внутрицикловых параметров анализировали по 5 образцов каждой концентрации малонового диальдегида. Результаты данного теста представлены в табл. 3. Значения межцикловых параметров представлены в табл. 4. Полученные величины точности и прецизионности соответствовали принятым нормам (не более 20% для нижнего предела количественного определения и не более 15% для остальных точек).

Стабильность. Стабильность растворов МДА в концентрациях 600 и 16 000 нмоль/л в лизате клеток

Таблица 4

Точность и прецизионность методик количественного определения малонового диальдегида в транспортной среде между аналитическими циклами

Концентрация номинальная, нмоль/л	Концентрация рассчитанная, нмоль/л	Точность, %	Средняя концентрация, нмоль/л	Средняя точность, %	SD	Прецизионность, %
600	703	17,17	615	2,5	76,12	12,37
	577	3,83				
	566	5,67				
2000	2259	12,95	2103	5,15	141,05	6,7
	1984	0,80				
	2067	3,35				
16000	16040	0,25	15803	1,23	294,72	1,86
	15473	3,29				
	15896	0,65				



Хроматограмма матрицы с добавлением стандарта малонового диальдегида до конечной концентрации 600 нмоль/л.

оценивалась при краткосрочном хранении в условиях комнатной температуры, при хранении -80 °С в течение 60 сут, после пробоподготовки и нахождении в течение 24 ч в автосемплере. Анализировали по 3 образца для каждой концентрации и каждого вида стабильности.

Правильность для каждой концентрации (для средних значений) находилась в пределах 15% от номинальных значений.

Матричный эффект. Определяли площади пиков образцов с добавлением исследуемого вещества (МДА) в концентрациях 600 и 16000 нмоль/л в присутствии лизата клеток (матрицы) и чистого раствора МДА в такой же концентрации в отсутствие матрицы (см. рисунок). Относительное стандартное отклонение матричного эффекта, рассчитанное для серии из 6 образцов, не превысило 15%.

Перенос пробы. При последовательном анализе пробы холостой транспортной среды после пробы с концентрацией 20 000 нмоль/л на хроматограмме транспортной среды отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пику МДА.

Разработанная биоаналитическая методика является чувствительной, селективной, точной, прецизионной и может быть использована для количественной оценки МДА при физиологических и патологических состояниях.

Обсуждение. МДА является высокорективным соединением [21], поэтому при проведении количественного анализа, стоит учитывать, что он может связываться с аминокислотами и белками, а значит присутствует в образце в свободном и связанном виде [22]. Свободный МДА легко вступает в реакцию с ТБК (или другим агентом дериватизации), а связанный МДА должен вернуться в свою свободную форму перед вступлением в реакцию [23]. Некоторая часть связанного МДА становится свободной в процессе дериватизации, однако этот процесс не является контролируемым и не имеет определенного процентного выхода, что будет отражаться на конечном результате [23].

Предложенный метод определения МДА включает процесс предварительной обработки проб ацетонитрилом, что способствует осаждению белка [24] и высвобождению связанного МДА, таким образом, в результате анализа определяется его общее количество.

Кроме этого, методика отличается от существующих аналогов отсутствием стадии дериватизации с реагентами, что, во-первых, позволяет определять свободный МДА, во-вторых, сокращает время анализа, исключая стадию кипячения (реакция с ТБК длится 45 мин при 100 °С).

В сравнении с другими методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС/МС определения концентрации МДА, в разработанной методике не используется дериватизация и твердофазная экстракция, что существенно упрощает процедуру анализа [25].

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения МДА методом ВЭЖХ-МС/МС. Валидация выполнена по следующим параметрам: линейность, селективность, точность, прецизионность, предел количественного определения, стабильность образцов, перенос пробы, матричный эффект. Предложенная методика отличается стадией осаждения

белка, в ходе которой высвобождается связанный МДА, и отсутствием реакции дериватизации. Нижний предел количественного обнаружения составил 600 нмоль/л, объем необходимой пробы 10 мкл, время анализа 7 минут. Полученный в ходе исследования диапазон концентраций дает возможность использовать данную биоаналитическую методику для определения концентрации МДА в биологическом материале при оценке физиологических и патологических состояний.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-7, 10-17, 19-25 см. REFERENCES)

8. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Максаев Д.А. Клиническая эффективность биофлавоноидов в лечении лимфедемы нижних конечностей. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2021; 29(2): 245-50. DOI: 10.17816/PAVLOVJ63283.
9. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Егоров А.А., Никулина Н.Н., Никифоров А.А. Эндотелиальная дисфункция у пациентов на программном гемодиализе. *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7(1): 79-85. DOI:10.23888/HMJ20197179-85.
18. Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. М.: Гриф и К; 2013.

REFERENCES

1. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev. Plant Biol.* 2004; 55: 373-99. DOI: 10.1146/annurev.arplant.
2. Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2005; 15(4): 316-28. DOI: 10.1016/j.numecd.2005.05.003.
3. García-Ruiz I., de la Torre P., Díaz T., Esteban E., Fernández I., Muñoz-Yagüe T., Solís-Herruzo J.A. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(34): 30551-8. DOI: 10.1074/jbc.M203368200.
4. Wang X., Lei X.G., Wang J. Malondialdehyde regulates glucose-stimulated insulin secretion in murine islets via TCF7L2-dependent Wnt signaling pathway. *Mol. Cell Endocrinol.* 2014; 382(1): 8-16. DOI: 10.1016/j.mce.2013.09.003.
5. Sri Iswari R., Dafip M., Purwantoyo E. Malondialdehyde (MDA) Production in Atherosclerosis Supplemented with Steamed Tomato. *Pak. J. Biol. Sci.* 2021; 24(3): 319-25. DOI: 10.3923/pjbs.2021.319.325.
6. Moore C.J., Shao C.H., Nagai R., Kutty S., Singh J., Bidasee K.R. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts are not formed on cardiac ryanodine receptor (RyR2) and sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2) in diabetes. *Mol. Cell Biochem.* 2013; 376(1-2): 121-35. DOI: 10.1007/s11010-013-1558-1.
7. Mazloomi S., Alimohammadi S., Khodadadi I., Ghiasvand T., Shafiee G. Evaluation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) activity and the levels of homocysteine and malondialdehyde (MDA) in the serum of women with preeclampsia. *Clin. Exp. Hypertens.* 2020; 42(7): 590-4. DOI: 10.1080/10641963.2020.
8. Kalinin R.E., Suchkov I.A., Maksaev D.A. Clinical effectiveness of bioflavonoids in the treatment of secondary lower limb lymphedema. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik imeni akad. I.P. Pavlova*. 2021; 29(2): 245-50. DOI: 10.17816/PAVLOVJ63283. (in Russian)
9. Kalinin R.E., Suchkov I.A., Egorov A.A., Nikulina N.N., Nikiforov A.A. Endothelial dysfunction in program hemodialysis-dependent patients. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7(1): 79-85. DOI:10.23888/HMJ20197179-85. (in Russian)
10. Mihara M., Uchiyama M., Fukuzawa K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in

aging, CCl4 intoxication, and vitamin E deficiency. *Biochem. Med.* 1980; 23(3): 302-11. DOI: 10.1016/0006-2944(80)90040-x.

11. Sun Q., Faustman C., Senecal A., Wilkinson A.L., Furr H. Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerated storage. *Meat Sci.* 2001; 57: 55-60.
12. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.* 2017; 524:13-30. DOI: 10.1016/j.ab.2016.10.021.
13. Yu L.W., Latriano L., Duncan S., Hartwick R.A., Witz G. High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans,trans-muconaldehyde. *Anal. Biochem.* 1986; 156(2): 326-33. DOI: 10.1016/0003-2697(86)90261-7.
14. Cordis G.A., Das D.K., Riedel W. High-performance liquid chromatographic peak identification of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection. *J. Chromatogr.* 1998; 798(1-2): 117-23. DOI: 10.1016/S0021-9673(97)01161-8.
15. Tsikas D., Rothmann S., Schneider J.Y., Suchy M.T., Trettin A., Modun D., Stuke N., Maassen N., Frölich J.C. Development, validation and biomedical applications of stable-isotope dilution GC-MS and GC-MS/MS techniques for circulating malondialdehyde (MDA) after pentafluorobenzyl bromide derivatization: MDA as a biomarker of oxidative stress and its relation to 15(S)-8-iso-prostaglandin F2 α and nitric oxide (NO). *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2016; 019: 95-111. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.10.009.
16. Tsikas D. Pentafluorobenzyl bromide-A versatile derivatization agent in chromatography and mass spectrometry: I. Analysis of inorganic anions and organophosphates. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2017; 1043: 187-201. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.08.015.
17. Langille E., Lemieux V., Garant D., Bergeron P. Development of small blood volume assays for the measurement of oxidative stress markers in mammals. *PLoS One.* 2018; 13(12): e0209802. DOI: 10.1371/journal.pone.0209802.
18. Study of bioequivalence of reproduced medicines. Guidelines for the examination of medicines. Vol. I. [Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I]. Moscow: Grif i K; 2013]. (in Russian)
19. Bioanalytical method validation guidance for industry. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM): Biopharmaceutics; 2018.
20. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London; 2011.
21. Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 1991; 11(1): 81-128. DOI: 10.1016/0891-5849.
22. De Vecchi A.F., Bamonti F., Novembrino C., Ippolito S., Guerra L., Lonati S. et al. Free and total plasma malondialdehyde in chronic renal insufficiency and in dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24(8): 2524-9. DOI: 10.1093/ndt/gfp102.
23. Carbonneau M.A., Peuchant E., Sess D., Canioni P., Clerc M. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin. Chem.* 1991; 37(8): 1423-9.
24. Kong R. LC/MS Application in High-Throughput ADME Screen. *Separation Science and Technology.* 2005; 6: 413-46. DOI:10.1016/S0149-6395(05)80061-3.
25. Yonny M.E., Rodríguez Torressi A., Nazareno M.A., Cerutti S. Development of a Novel, Sensitive, Selective, and Fast Methodology to Determine Malondialdehyde in Leaves of Melon Plants by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Methods Chem.* 2017; 2017: 4327954. DOI: 10.1155/2017/4327954.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Даренская М.А.^{1,2}, Ступин Д.А.^{1,2}, Семендяев А.А.², Колесников С.И.¹, Гребенкина Л.А.², Щербатых А.В.², Толкачев К.С.², Колесникова Л.И.¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОМ И РЕГИОНАРНОМ КРОВОТОКАХ У ЖЕНЩИН С ПЕРВИЧНЫМ ВАРИКОЗНЫМ РАСШИРЕНИЕМ ВЕН МАЛОГО ТАЗА

¹ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 664003, Иркутск, Россия;²ФГБОУ «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 664022, Иркутск, Россия

Варикозное расширение вен малого таза (ВРВМТ) у женщин – полиэтиологичное мультифакторное заболевание, характеризуется широкой распространенностью (до 80%), высоким риском бесплодия, прогрессирующим рецидивирующим течением. При ВРВМТ, вследствие длительного воздействия на венозную стенку динамической гипертонии и гипертензии, имеют место морфологические изменения венозного русла, способствующие формированию ретроградного потока крови и тазовой флебогипертензии. Однако рассмотрение патогенеза ВРВМТ только с позиции венозных гемодинамических нарушений не объясняет всех механизмов развития заболевания, что не способствует эффективности лечебных мероприятий. Реакции окислительного стресса в настоящее время рассматриваются в качестве важнейших маркеров деструктивных проявлений патологического процесса. В связи с этим, целью нашей работы являлся сравнительный анализ изменений компонентов липопероксидации-антиоксидантной защиты в периферическом и регионарном кровотоках у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза в зависимости от стадии заболевания. В исследовании приняли участие 137 женщин репродуктивного возраста (средний возраст – 37,4±9,1 года) с диагностированным первичным ВРВМТ, разделенные на 3 группы по стадиям патологического процесса (I, II, III стадии). В качестве контроля использовались данные 30 практически здоровых женщин (средний возраст – 33,5±6,3 года). Применялись спектрофотометрические, флюорометрические, иммуноферментные и статистические методы исследования. У пациенток с I стадией ВРВМТ в периферическом кровотоке различия касались более высоких значений активности СОД и ГПО; в регионарном кровотоке – повышенных уровней ТБК-АП, СОД, каталазы и ГПО и сниженных – GSH. На II стадии ВРВМТ в периферическом кровотоке отмечались повышенные уровни ДК и сниженные – СОД и GSH; в регионарном кровотоке – более высокое содержание ДК, ТБК-АП, ГПО и сниженный уровень GSH относительно контроля. III стадия ВРВМТ характеризовалась: в периферическом кровотоке – более высокими значениями ДК, ТБК-АП и сниженными значениями СОД и GSH; в регионарном – повышенными уровнями ДК, ТБК-АП и сниженными значениями GSH и каталазы относительно контроля. Таким образом, результаты нашего исследования не показали значимых различий в системе липопероксидации-антиоксидантной защиты между периферическим и регионарным кровотоками у пациенток с ВРВМТ в зависимости от стадии заболевания. Однако негативные изменения редокс-баланса в регионарном кровотоке носили более ранний характер и регистрировались уже на первой стадии заболевания. Вероятно, что контроль антиоксидантной недостаточности у пациенток с ВРВМТ должен быть важной составляющей профилактических мероприятий на ранних стадиях и патогенетического лечения при прогрессировании патологического процесса, в частности, на III стадии развития заболевания.

Ключевые слова: липопероксидация; антиоксидантная защита; варикозное расширение вен малого таза; женщины.

Для цитирования: Даренская М.А., Ступин Д.А., Семендяев А.А., Колесников С.И., Гребенкина Л.А., Щербатых А.В., Толкачев К.С., Колесникова Л.И. Сравнительный анализ липопероксидации в периферическом и регионарном кровотоках у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (7): DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-374-380>

Для корреспонденции: Даренская Марина Александровна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патофизиологии, e-mail: marina_darenskaya@inbox.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 06.12.2021

Принята к печати 20.12.2021

Опубликовано 00.07.2022

Darenskaya M.A.¹, Stupin D.A.^{1,2}, Semendyaev A.A.², Kolesnikov S.I.¹, Grebenkina L.A.¹, Shcherbatykh A.V.², Tolkachev K.S.², Kolesnikova L.I.¹

PERIPHERAL AND REGIONAL BLOOD BLOODSTREAMS LIPID PEROXIDATION COMPARATIVE ANALYSIS IN WOMEN WITH PELVIC VENOUS DISORDER

¹Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, 664003, Irkutsk, Russia;

²Irkutsk State Medical University, 664022, Irkutsk, Russia

Pelvic venous disorder (PVD) in women is a polyetiological multifactorial disease characterized by a high prevalence (up to 80%), a high risk of infertility, and a progressive recurrent course. Morphological changes of the venous bed occur in PVD, contributing to retrograde blood flow and pelvic phlebohypertension. It is occur due to dynamic hypervolemia and hypertension long-term exposure on the venous wall. However, PVD pathogenesis analysis only from venous hemodynamic disorders position does not explain all mechanisms of the disease development and does not contribute to the treatment measures effectiveness. Currently oxidative stress reactions are considered as the most important markers of the pathological process. The aim of our work was a comparative analysis of lipid peroxidation-antioxidant defense component changes in the peripheral and regional blood flow in women with primary pelvic venous disorder depending on the disease stage. The study involved 137 women of

reproductive age (mean age 37.4±9.1 years old) with diagnosed primary PVD divided into 3 groups according to the pathological process stages (stages I, II, III). Data from 30 practically healthy women (mean age 33.5±6.3 years old) were used as controls. Spectrophotometric, fluorometric, immunoassay and statistical methods were used. In patients with PVD stage I in peripheral bloodstream were higher values of SOD and GPO activity; in the regional bloodstream were higher levels of TBARs, SOD, catalase, GPO and lower GSH. In PVD stage II the peripheral bloodstream showed elevated levels of DC, GSH and SOD reduced levels; the regional bloodstream showed higher levels of DC, TBARs, GPO and GSH reduced levels relative to controls. PVD stage III was characterized by: higher levels of DC and TBARs and lower levels of SOD and GSH in the peripheral bloodstream; higher levels of DC, TBARs and lower levels of GSH and catalase in the regional bloodstream compared with control. Thus, the results of our study showed no significant differences in the LPO-AOD system between peripheral and regional bloodstreams in patients with PVD depending on the disease stage. However, negative changes in the redox balance in the regional bloodstream were earlier and were already registered at the first stage of the disease. It is likely that control of antioxidant insufficiency in patients with PVD should be an important component of preventive measures in the early stages and pathogenetic treatment in the pathological process progression, particularly in stage III of the disease.

Key words: lipid peroxidation; antioxidant defense; pelvic venous disorder; women.

For citation: Darenskaya M.A., Stupin D.A., Semendyaev A.A., Kolesnikov S.I., Grebenkina L.A., Shcherbatykh A.V., Tolkachev K.S., Kolesnikova L.I. Peripheral and regional blood streams lipid peroxidation comparative analysis in women with pelvic venous disorder. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (7):374-380 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-374-380>

For correspondence: Darenskaya Marina Alexandrovna, Doctor of Biological Sciences, Leading researcher of the Laboratory of Pathophysiology; e-mail: marina_darenskaya@inbox.ru

Information about authors:

Darenskaya M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3255-2013>;
Stupin D.A., <https://orcid.org/0000-0002-0687-4804>;
Semendyaev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-4107-6285>;
Kolesnikov S.I., <https://orcid.org/0000-0003-2124-6328>;
Grebenkina L.A., <https://orcid.org/0000-0002-1263-5527>;
Shcherbatykh A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1990-1207>;
Tolkachev K.S., <https://orcid.org/0000-0002-5709-5851>;
Kolesnikova L.I., <https://orcid.org/0000-0003-3354-2992>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 06.12.2021

Accepted 20.12.2022

Published 00.07.2022

Введение. Варикозное расширение вен малого таза (ВРВМТ) у женщин – полиэтиологичное мультифакторное заболевание, выделенное отдельно в соответствии с локализацией варикозной трансформации (шифр по МКБ-Х – I86.2) [1]. ВРВМТ характеризуется широкой распространенностью (до 80%), высоким риском бесплодия, прогрессирующим рецидивирующим течением [2,3]. Важными факторами патогенеза ВРВМТ являются генетическая предрасположенность, возраст, воздействия внешней среды, нарушения эпигенетической регуляции и т.д. [4, 5]. К основным проблемам диагностики ВРВМТ относят отсутствие специфических лабораторных маркеров и клинической симптоматики, характерных для начальных проявлений заболевания [2, 6]. Среди клинических проявлений выделению подлежат: наличие хронических тазовых болей, диспареуния, циклические и ациклические кровотечения и другие симптомы [1, 3, 7]. Возможно и бессимптомное течение заболевания [3]. Большинство специалистов рассматривают ВРВМТ в тесной взаимосвязи с длительным воздействием на венозную стенку динамической гиперволемии и гипертензии, являющихся фоном патологического процесса [8,9]. Вследствие чего, имеют место быть морфологические изменения венозного русла, способствующие формированию ретроградного потока крови, перфузионным нарушениям, тазовой флегмогипертензии [10]. Однако рассмотрение патогенеза ВРВМТ только с позиции венозных гемодинамических нарушений не объясняет всех механизмов разви-

тия заболевания, что не способствует эффективности лечебных мероприятий [11].

Реакции окислительного стресса (ОС) в настоящее время рассматриваются в качестве важнейших маркеров деструктивных проявлений патологического процесса [12 – 16]. Чрезмерное производство активных форм кислорода (АФК) при ВРВМТ обусловлено тазовыми венозными дисциркуляторными нарушениями, гипоксемией и ишемией органов, ускоряющих образование токсичных продуктов липопероксидации при одновременном снижении процессов их обезвреживания [17, 18]. При этом, интересным представляется изучение изменений в системе липопероксидации-антиоксидантной защиты, как важной характеристики реакций ОС у женщин с ВРВМТ как на системном, так и на локальном уровнях.

Цель нашей работы – провести сравнительный анализ изменений компонентов липопероксидации-антиоксидантной защиты в периферическом и регионарном кровотоках у женщин с первичным варикозным расширением вен малого таза в зависимости от стадии заболевания.

Материал и методы. В исследовании приняли участие 137 женщин репродуктивного возраста (средний возраст – 37,4±9,1 года) с диагностированным первичным ВРВМТ и 30 практически здоровых женщин (средний возраст 33,5±6,3 года).

Диагноз и стадия ВРВМТ устанавливались на основании результатов ультразвукового исследования (УЗИ) с дуплексным ангиосканированием [19]. Объективными метрическими показателями яичниковых вен

являлись максимальный диаметр просвета магистрального ствола вен, длительность рефлюксного кровотока в общем стволе яичниковых вен в состоянии покоя, вовлеченность венозных сплетений малого таза [6,19]. В соответствии с данными параметрами пациентки с ВРВМТ были разделены на 3 подгруппы в соответствии со стадиями заболевания – I, II, III стадии. У женщин контрольной группы анатомо-гемодинамические показатели в магистральном стволе яичниковых вен соответствовали нормальным параметрам. Взятие крови у пациенток и в группе контроля осуществляли из периферического и регионарного кровотоков.

Критерии включения пациенток с ВРВМТ: репродуктивный возраст (20–45 лет), информированное согласие об участии, подтвержденный диагноз по результатам УЗИ с дуплексным ангиосканированием. Критерии исключения: наличие сопутствующей соматической патологии, гинекологических заболеваний и органических поражений в малом тазу.

Критерии включения в контрольную группу: сопоставимость по возрасту, полу, месту проживания и другим основным критериям; отсутствие на момент обследования острого заболевания или обострения хронических заболеваний, отсутствие патологии венозной системы. Критерии исключения для клинической и контрольной групп: беременность; прием в течение последних 6 месяцев препаратов венотонизирующего, ангиопротективного, антиоксидантного действия или синтетических аналогов женских половых гормонов (гормональные контрацептивы).

Взятие крови из периферического кровотока осуществляли утром натощак из локтевой вены в объеме 10 мл однократно. Забор крови из регионарного кровотока осуществляли из коллатеральных притоков яичниковых вен во время выполнения лапароскопии на оборудовании “Karl Storz” (Германия) и “Cooper Surgical” (США) с использованием трехмерной видеорегистрации “Laser Optic System” (США, Германия). В качестве материала для исследования использовали плазму и гемолизат эритроцитов. Интенсивность процессов липопероксидации определяли спектрофотометрическими методами по содержанию диеновых конъюгатов (ДК) и флюорометрическим методом по уровню ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) липопероксидации [20, 21]. О состоянии системы антиоксидантной защиты судили по: активности супероксиддисмутазы (СОД) [22], содержанию восстановленного глутатиона (GSH) [23], а также активности каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и глутатион-S-трансферазы (Г-S-T) с помощью коммерческих наборов фирмы Randox (Великобритания). Измерения проводили на спектрофлуорофотометре Shimadzu RF-1501 (Япония), спектрофотометре Shimadzu RF-1650 (Япония) и микропланшетном ридере MultiSkan ELX808 (Biotek, США).

Получение информированного согласия на участие в исследовании было обязательной процедурой при включении женщин в одну из групп. Были соблюдены этические принципы согласно Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (1964, ред. 2013)). Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (выписка из протокола заседания № 3.1 от 26.10.2012 г.).

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием пакета комплексной обработки данных

Statistica 8,0 (StatSoft Inc., США) (правообладатель лицензии — ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»). Для представления количественных данных приводили среднее (M) и стандартное отклонение (σ). Для определения нормальности распределения количественных признаков использовали визуально-графический метод и критерии согласия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса и Шапиро–Уилка. В зависимости от вида распределения использовали параметрический t-критерий Стьюдента (при нормальном распределении данных) или непараметрический критерий Манна–Уитни (при распределении, отличном от нормального). Критический уровень значимости принимался равным 5% (0,05).

Результаты и обсуждение. Результаты исследования у пациенток с ВРВМТ с I стадией патологического процесса показали наличие статистически значимых различий в показателях процесса липопероксидации-антиоксидантной защиты как в периферическом, так и в регионарном кровотоках относительно контроля (рис. 1). Так, в периферическом кровотоке различия касались более высоких значений активности СОД (в 1,35 раз выше) и ГПО (в 1,42 раза выше), в регионарном кровотоке отмечались повышенные значения ТБК-АП (в 1,24 раза выше), СОД (в 1,43 раза выше), каталазы (в 1,43 раза выше) и ГПО (в 1,7 раза выше) и сниженные – GSH (в 1,37 раза ниже) (см. рис. 1, А,Б).

II стадия патологического процесса у женщин с ВРВМТ характеризовалась изменениями в периферическом кровотоке в виде повышенных уровней ДК (в 1,56 раза выше) и сниженных – СОД (в 1,35 раза ниже) и GSH (в 1,64 раза ниже); в регионарном кровотоке – более высокого уровня ДК (в 1,69 раза выше), ТБК-АП (в 1,28 раза выше), ГПО (в 1,37 раза выше) и сниженного содержания GSH (в 2,14 раза ниже) относительно контроля (рис. 2, А, Б).

У пациенток с ВРВМТ III стадии патологического процесса наблюдались более выраженные изменения в исследуемых показателях: в периферическом кровотоке – более высокие уровни ДК (в 1,54 раза выше), ТБК-АП (в 1,77 раза выше) и сниженные значения СОД (в 1,65 раза ниже) и GSH (в 3,67 раза ниже); в регионарном – повышенные уровни ДК (в 1,71 раза выше), ТБК-АП (в 1,81 раза выше) и сниженные значения GSH (в 6,31 раза ниже) и каталазы (в 1,27 раза ниже) относительно контрольных значений (рис. 3, А, Б).

Варикозную болезнь вен в настоящее время рассматривают как системное прогрессирующее заболевание с мультифокальным поражением венозной системы [5]. ВРВМТ представляет собой регионарное проявление варикозного процесса с хроническим характером течения [3]. Вследствие множественности и разнообразия факторов, действующих на венозную стенку, а также неизбежной хронизации процесса, ВРВМТ трудно поддается лечению [3, 11]. Поэтому оптимальным представляется поиск биомаркеров ранних проявлений варикозной эктазии вен с целью проведения своевременных профилактических мероприятий.

Нами не было обнаружено значимых различий по показателям липопероксидации – антиоксидантной защиты между периферическим и регионарным кровотоками у женщин с ВРВМТ на всех стадиях развития патологического процесса. При этом, относительно контрольных значений различия в кровотоках имелись. Так, на I стадии ВРВМТ в периферическом кровотоке относительно

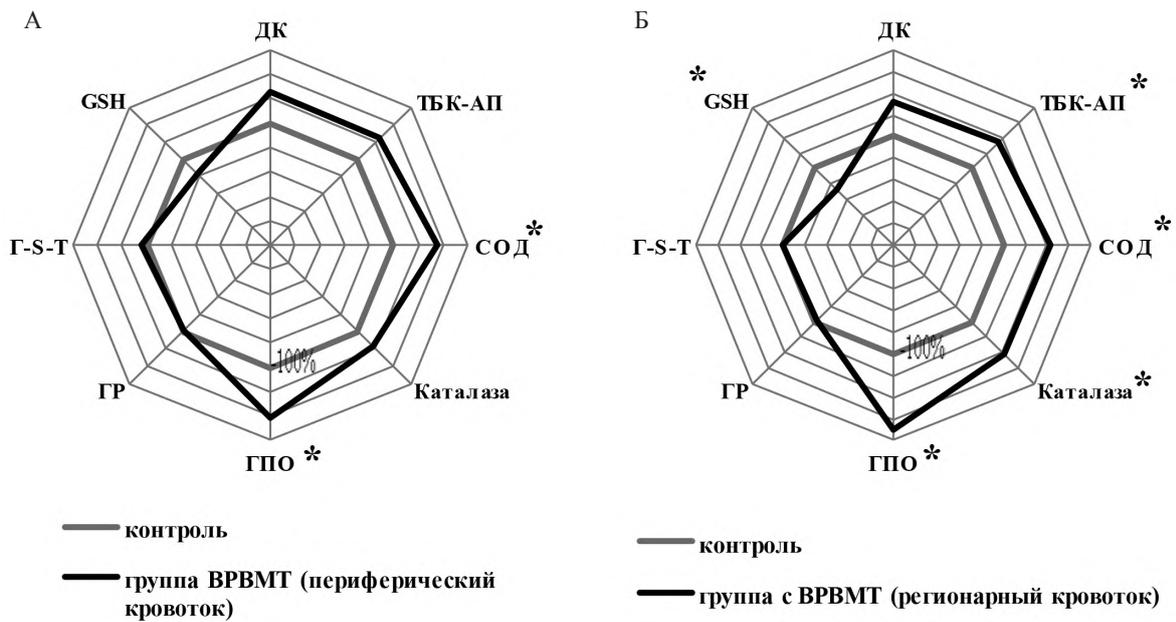


Рис. 1. Динамика изменений показателей системы липопероксидации-антиоксидантной защиты у женщин с ВРВМТ на I стадии развития патологического процесса в периферическом (А) и регионарном (Б) кровотоках. Здесь и на рис. 2, 3: за 100% приняты значения контрольной группы, * – статистически значимые различия по отношению к контролю.

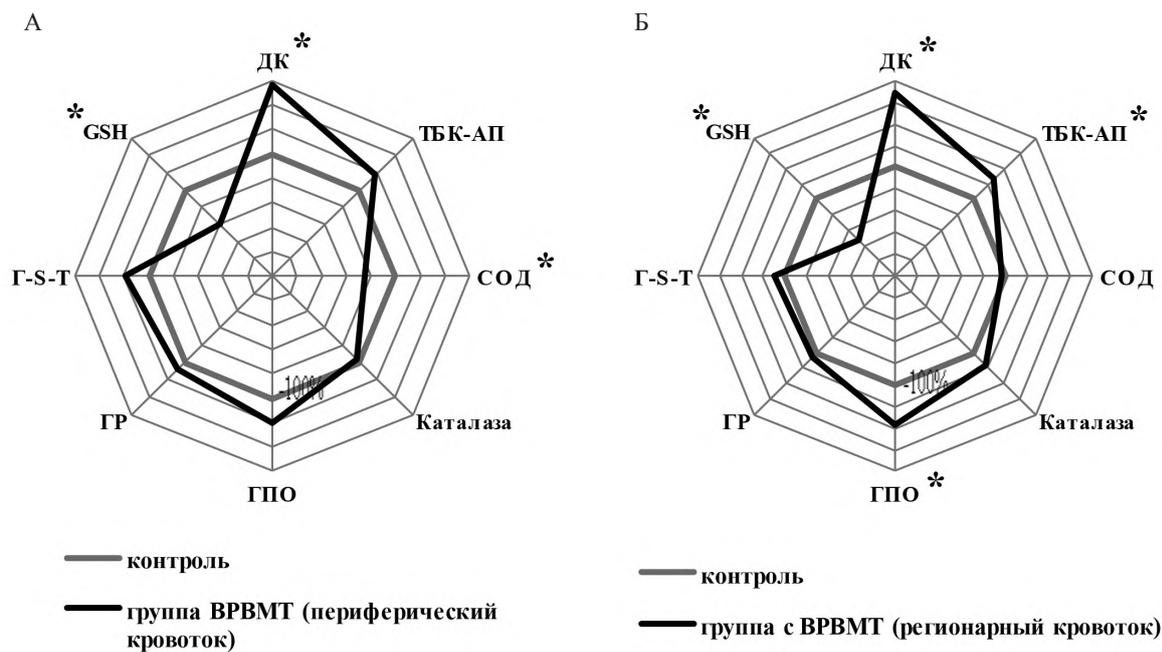


Рис. 2. Динамика изменений показателей системы липопероксидации-антиоксидантной защиты у женщин с ВРВМТ на II стадии развития патологического процесса в периферическом (А) и регионарном (Б) кровотоках.

контроля отмечалась повышенная активность ферментов антиоксидантной защиты – СОД и ГПО, что может свидетельствовать о наличии компенсаторных влияний со стороны системы антиоксидантной защиты. В регионарном кровотоке на I стадии ВРВМТ отмечались повышенные значения активности ферментов-антиоксидантов (СОД, каталазы и ГПО), более высокие уровни концентрации конечных ТБК-активных продуктов и сниженное содержание GSH относительно контроля. Судя по указанным результатам, можно говорить о более выраженных изменениях и начальных проявлениях

дисбаланса в редокс-системе на регионарном уровне у женщин с I стадией ВРВМТ. На текущий момент генерация АФК считается неотъемлемым патогенетическим фактором ВРВМТ. Основным инициатором избыточной продукции АФК при ВРВМТ является локальная застойная венозная гемодинамика, инициирующая гипоксию и сниженную сатурацию [24]. Дисфункция эпителия, развивающаяся при этом, может способствовать дальнейшему усилению реакций ОС, что приводит к снижению регенераторных возможностей, резистентности [17]. Присоединение воспалительного процесса в услови-

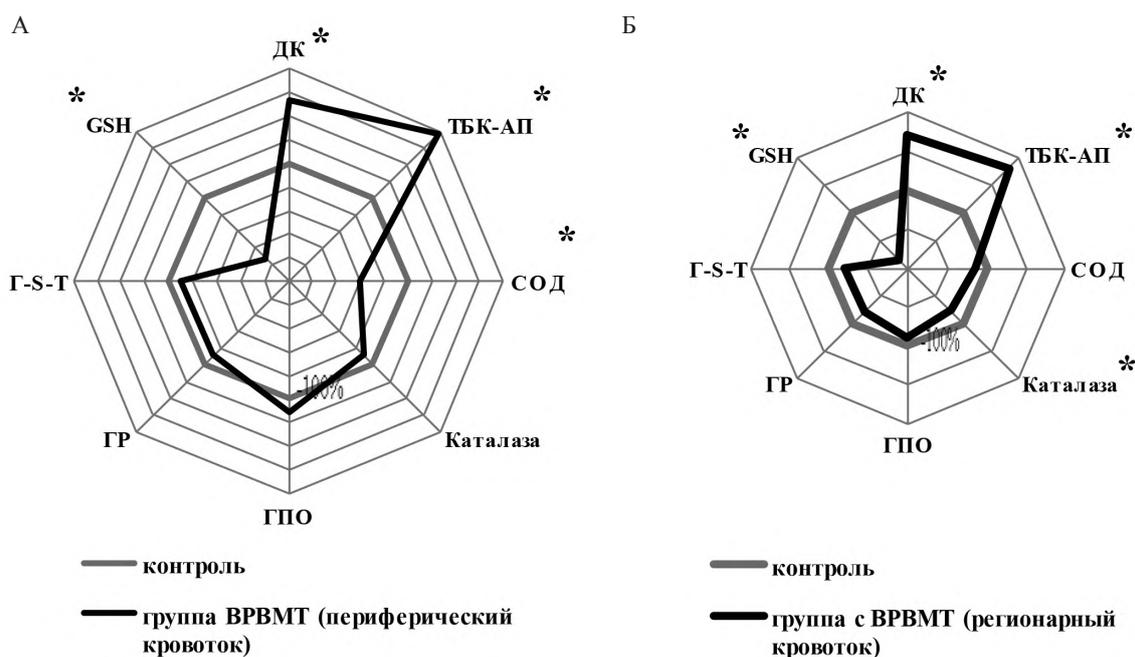


Рис. 3. Динамика изменений показателей системы липопероксидации-антиоксидантной защиты у женщин с ВРВМТ на III стадии развития патологического процесса в периферическом (А) и регионарном (Б) кровотоках.

ях ВРВМТ усугубляет повреждение стенок вен за счет лейкоцитарной агрессии, которая приводит к прогрессированию нарушений целостности венозного каркаса [5, 25]. Так, на II стадии развития патологического процесса мы наблюдали высокие значения ДК, резкое падение активности СОД и уровня GSH в периферическом кровотоке, а также повышенные уровни первичных и конечных продуктов липопероксидации, активности ГПО и сниженный уровень GSH в регионарном кровотоке. Рост концентрации продуктов липопероксидации на различных этапах, как правило, свидетельствует о быстром вовлечении данного рода процессов в патогенетические механизмы развивающихся структурно-функциональных нарушений в тканях [12]. Установлено, что накопление токсичных метаболитов липопероксидации способствуют хронизации патологического процесса и прогрессированию клапанной венозной недостаточности [26]. Присоединение динамической гипертензии, формирование «застойной» гемодинамики способствуют увеличению продукции АФК, которые оказывают повреждающее действие на сосудистую стенку вен с развитием перфузионных нарушений, характерных для дальнейших стадий ВРВМТ [27]. Лимитирующим фактором скорости реакций липопероксидации является высокая активность антиоксидантных компонентов, составляющих систему антиоксидантной защиты [28,29]. На II стадии ВРВМТ наблюдалось снижение активности СОД и уровня GSH. Более низкие значения активности СОД можно объяснить усилением прооксидантных процессов у пациенток с прогрессирующей формой ВРВМТ. СОД относится к гидрофильным соединениям, инактивирующим супероксидный радикал с переходом его в электронно-нейтральную форму – перекись водорода. Однако, в условиях патологии, АФК могут ингибировать антиоксидантную активность ферментов, в частности, повреждая структуру их белковых молекул [30]. Необходимо отметить развивающийся дефицит GSH в

группе пациенток со II стадией заболевания в обоих видах кровотока. Данный тиоловый компонент является субстратом для глутатионзависимых ферментов, таким образом, выступая «донором» атомов водорода для гидроперекисей липидов [31]. Активное участие GSH в реализации различных метаболических реакций позволяет говорить о дисрегуляции в работе тиол-дисульфидного звена антиоксидантной защиты, а также значительном снижении резистентности клеток к воздействию патогенных факторов у пациенток со II стадией заболевания [12].

III стадия развития патологического процесса сопровождалась более выраженными изменениями в системе липопероксидации-антиоксидантной защиты как в периферическом, так и в регионарном кровотоке по сравнению с предыдущими, I и II стадиями. Причем, на данном этапе заболевания изменения в обоих типах кровотока носили практически идентичный характер. Так, отмечалось накопление первичных и конечных продуктов липопероксидации и значительный дефицит восстановленной формы глутатиона. Помимо антиоксидантной роли, глутатион выполняет многочисленные функции в качестве кофермента, активно участвует в синтезе эйкозаноидов и защите клеточных структур от ксенобиотиков, способствует сохранению целостности биомембран, является важнейшим регулятором факторов апоптоза и т.д. [32]. Выяснено, что его снижение нарушает сигнальную трансдукцию в клетках, экспрессию генов, клеточную пролиферацию и дифференцировку клеток [31]. Таким образом, можно говорить о значительном негативном влиянии дефицита данного антиоксиданта у женщин с ВРВМТ в условиях хронизации процесса. Что касается активности ферментов-антиоксидантов у пациенток с III стадией, то, если в периферическом кровотоке отмечалось снижение активности СОД, то в регионарном – каталазы. Каталаза, как и ГПО, имеет жизненно важное значение в поддержании нормального уровня пероксида

водорода в крови, вследствие чего снижение ее активности в регионарном кровотоке может свидетельствовать о разбалансировке антиоксидантных реакций на вторичном этапе обезвреживания АФК и указывать на выраженность ОС на III стадии ВРВМТ. Полагают, что механизм трансформации вен при варикозе обусловлен повреждающим действием АФК на эндотелиоциты, что приводит к их метаплазии и замещению гладкомышечных клеток фиброзной тканью [26].

Заключение. Таким образом, результаты нашего исследования не показали значимых различий в системе липопероксидации-антиоксидантной защиты между периферическим и регионарным кровотоками у пациентов с ВРВМТ. Однако негативные изменения редокс-баланса в регионарном кровотоке носили более ранний характер и регистрировались уже на I стадии заболевания. При хроническом течении процесса, на III стадии ВРВМТ, изменения в обоих типах кровотока носили практически идентичный характер в виде интенсивного накопления первичных и конечных продуктов липопероксидации и выраженного дефицита восстановленной формы глутатиона. Вероятно, контроль антиоксидантной недостаточности у пациентов с ВРВМТ должен быть важной составляющей профилактических мероприятий на ранних стадиях, и патогенетического лечения при прогрессировании патологического процесса, в частности, на III стадии развития заболевания.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 6, 7, 9, 17-18, 22-28, 30-32 см. REFERENCES)

2. Фомин В.С., Фомина М.Н. Варикозное расширение вен малого таза как причина синдрома хронических тазовых болей: взгляд на проблему. *Фарматека*. 2017; 18(351): 14-9.
4. Серяпина Ю.В., Севостьянова К.С., Тулупов А.А., Морозов В.В., Шевела А.И. Генетические предикторы варикозной болезни малого таза: пилотное исследование. *Флебология*. 2018; 12(1): 25-9.
5. Колесникова Л.И., Гус А.И., Семендяев А.А., Ступин Д.А., Даренская М.А., Колесников С.И. и др. Варикозная болезнь вен малого таза у женщин. Новосибирск: Наука; 2020.
8. Ахметзянов Р.В., Бредихин Р.А., Фомина Е.Е., Коновалова Е.Ф. Гистологические изменения стенки яичниковой вены при варикозной болезни таза. *Флебология*. 2020; 14(3): 166-74.
10. Жук С.И., Григоренко А.М., Шляхтина А.О. Этиопатогенетический подход к консервативному лечению варикозного расширения вен малого таза у женщин. *Здоровье женщины*. 2017; 2: 77-82.
11. Гус А.И., Колесникова Л.И., Семендяев А.А., Ступин Д.А., Щербатых А.В., Калягин А.Н. и др. Оптимизация тактики ведения женщин с варикозным расширением вен малого таза. *Акушерство и гинекология*. 2019; 4: 58-64.
12. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Колесников С.И. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16(4): 16-29.
13. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Осипова Е.В., Долгих М.И., Семенова Н.В. Анализ антиоксидантного статуса и фактического питания студенток. *Вопросы питания*. 2015; 84(4): 66-73.
14. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Лябыгина А.В., Сутурина Л.В., Долгих М.И. и др. Характеристика процессов липопероксидации у женщин различных популяций с гиперпролактинемией и бесплодием. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2011; 60 (5): 55-61.
15. Клычникова Е.В., Рябинин В.А., Матвеев С.Б., Годков М.А., Голиков А.П., Ахметов В.В. и др. Показатели окислительного стресса и их взаимосвязь со значениями липидного обмена у больных с тяжелым течением гипертонической болезни в сочетании с атеросклерозом сонных артерий.

Клиническая лабораторная диагностика. 2010; 9: 60-4.

16. Титов В.Н. С-реактивный белок: гетерогенность и функциональная связь с окислительным стрессом как с маркером воспаления. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2004; 7: 3-12.
19. Семендяев А.А., Ступин Д.А., Черепанова М.А., Бачурина С.М., Селецкий А.Н., Колесникова Л.И. Способ определения функционального состояния венозной системы малого таза у женщин. Патент РФ № 2646563; 2018.
20. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии*. 1989; 35(1): 127-31.
21. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой. *Вопросы медицинской химии*. 1987; 1: 118-22.
29. Колесникова Л.И., Колесников С.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Тимофеева Е.В., Лещенко О.Я. и др. Оценка про- и антиоксидантного статуса у женщин с ВИЧ и коинфекцией. *Терапевтический архив*. 2016; 88(11): 17-21.

REFERENCES

1. Bendek B., Afuape N., Banks E., Desai, N.A. Comprehensive review of pelvic congestion syndrome: causes, symptoms, treatment options. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2020; 32(4): 237-42.
2. Fomin V.S., Fomina M.N. Varicose veins of the small pelvis as a cause of chronic pelvic pain syndrome: a look at the problem. *Farmateka*. 2017; 18(351): 14-9. (in Russian)
3. Riding D.M., Hansrani V., McCollum C. Pelvic vein incompetence: clinical perspectives. *Vascular health and risk management*. 2017; 13: 439.
4. Seryapina Yu.V., Sevost'yanova K.S., Tulupov A.A., Morozov V.V., Shevela A.I. The genetic predictors of varicose veins of small pelvis: a pilot study. *Flebologiya*. 2018; 12(1): 25-9. (in Russian)
5. Kolesnikova L.I., Gus A.I., Semendyaev A.A., Stupin D.A., Daren'skaya M.A., Kolesnikov S.I. et al. Varicose veins of the small pelvis in women. Novosibirsk: Nauka; 2020. (in Russian)
6. Akhmetzyanov R.V., Bredikhin R.A., Fomina E.E., Ignatyev I.M. Method of determining disease severity in women with pelvic varicose veins. *Angiology and Vascular Surgery*. 2019; 25(3): 79-87.
7. Khatrri G., Khan A., Raval G., Chhabra A. Diagnostic evaluation of chronic pelvic pain. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 2017; 28(3): 477-500.
8. Akhmetzyanov R.V., Bredikhin R.A., Fomina E.E., Konovalova E.F. Histological changes in the wall of the ovarian vein in varicose veins of the pelvis. *Flebologiya*. 2020; 14(3): 166-74. (in Russian)
9. Khilnani N.M., Winokur R.S., Scherer K.L., Meissner M.H. Clinical Presentation and Evaluation of Pelvic Venous Disorders in Women. *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*. 2021; 24(1): 100730.
10. Zhuk S.I., Grigorenko A.M., Shlyakhtina A.O. Etiopathogenetic approach to conservative treatment of varicose veins of the small pelvis in women. *Zdorov'e zhenshchiny*. 2017; 2: 77-82. (in Russian)
11. Gus A.I., Kolesnikova L.I., Semendyaev A.A., Stupin D.A., Shcherbatykh A.V., Kalyagin A.N. et al. Optimization of management tactics for women with varicose veins of the small pelvis. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2019; 4: 58-64. (in Russian)
12. Kolesnikova L.I., Daren'skaya M.A., Kolesnikov S.I. Free radical oxidation: a pathophysiologist's view. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2017; 16(4): 16-29. (in Russian)
13. Kolesnikova L.I., Daren'skaya M.A., Gребенкина L.A., Osipova E.V., Dolgikh M.I., Semenova N.V. Analysis of the antioxidant status and actual nutrition of female students. *Voprosy pitaniya*. 2015; 84(4): 66-73. (in Russian)
14. Kolesnikova L.I., Daren'skaya M.A., Gребенкина L.A., Labygina A.V., Sutura L.V., Dolgikh M.I. et al. Characterization of lipid peroxidation processes in women of various populations with hyperprolactinemia and infertility. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2011; 60 (5): 55-61. (in Russian)

BIOCHEMISTRY

15. Klychnikova E.V., Ryabinin V.A., Matveev S.B., Godkov M.A., Golikov A.P., Akhmetov V.V. et al. Indicators of oxidative stress and their relationship with the values of lipid metabolism in patients with severe hypertension in combination with carotid atherosclerosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2010; 9: 60-4. (in Russian)
16. Titov V.N. C-reactive protein: heterogeneity and functional relationship with oxidative stress as a marker of inflammation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2004; 7: 3-12. (in Russian)
17. Castro-Ferreira R., Cardoso R., Leite-Moreira A., Mansilha A. The role of endothelial dysfunction and inflammation in chronic venous disease. *Ann. Vasc. Surg.* 2018; 46: 380-93.
18. Zuo L., Prather E.R., Stetskiv M., Garrison D.E., Meade J.R., Peace T.I. et al. Inflammaging and oxidative stress in human diseases: from molecular mechanisms to novel treatments. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(18): 4472.
19. Semendyaev A.A., Stupin D.A., Cherepanova M.A., Bachurina S.M., Seletsky A.N., Kolesnikova L.I. Method for determining the functional state of the venous system of the small pelvis in women. Patent RF № 2646563; 2018. (in Russian)
20. Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G., Lifshits R.I. Comparison of different approaches to the determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1989; 35(1): 127-31. (in Russian)
21. Gavrilov V.B., Gavrilova A.R., Mazhul' L.M. Analysis of methods for determining the products of lipid peroxidation in blood serum by the test with thiobarbituric acid. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1987; 1: 118-22. (in Russian)
22. Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 1972; 247: 3170-5.
23. Hisin P.J., Hilf R. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 1976; 74: 214-26.
24. Pietrzycka A., Kózka M., Urbanek T., Stepniewski M., Kucharzewski M. Effect of micronized purified flavonoid fraction therapy on endothelin-1 and TNF- α levels in relation to antioxidant enzyme balance in the peripheral blood of women with varicose veins. *Curr.Vasc. Pharmacol.* 2015; 13(6): 801-8.
25. van Wetering S., van Buul J.D., Quik S., Mul F.P., Anthony E.C., Klooster J.P. et al. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *Journal of cell science*. 2002; 115(9): 1837-46.
26. Condezo-Hoyos L., Rubio M., Arribas S.M., España-Caparrós G., Rodríguez-Rodríguez P., Mujica-Pacheco E. et al. A plasma oxidative stress global index in early stages of chronic venous insufficiency. *Journal of vascular surgery*. 2013; 57(1): 205-13.
27. Saribal D., Kanber E.M., Hocaoglu-Emre F.S., Akyolcu M.C. Effects of the oxidative stress and genetic changes in varicose vein patients. *Phlebology*. 2019; 34(6): 406-13.
28. Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Sholokhov L.F., Rashidova M.A., Semenova N.V., Kolesnikov S.I. et al. Lipid peroxidation activity in women with chronic viral hepatitis. *Free Radical Biology & Medicine*. 2016; 100(S): S192.
29. Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Timofeeva E.V., Leshchenko O.Ya. et al. Assessment of pro- and antioxidant status in women with HIV and coinfection. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2016; 88(11): 17-21. (in Russian)
30. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*. 2015; 4: 180-3.
31. Adeoye O., Olawum, J., Opeyemi A., Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA assisted reproduction*. 2018; 22(1): 61.
32. Calabrese G., Morgan B., Riemer J. Mitochondrial glutathione: regulation and functions. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017; 27(15): 1162-77.

© ПОТЕРЯЕВА О.В., УСЫНИН И.Ф., 2022

Потеряева О.Н., Усынин И.Ф.

ЛИПОПРОТЕИНЫ ВЫСОКОЙ ПЛОТНОСТИ: ОТ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ К ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОЦЕНКЕ И ТЕРАПИИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Научно-исследовательский институт биохимии Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, 630117, г. Новосибирск, Россия

Антиатерогенная роль липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) связана, прежде всего, с их участием в обратном транспорте избытка холестерина из периферических тканей в печень. Эффективность данного механизма зависит от способности аполипопротеина А-I (apoA-I) – основного белкового компонента ЛПВП, захватывать холестерин из клеток. Как известно, акцепторные свойства данного белка могут изменяться под влиянием различных факторов. В обзоре обсуждаются современные подходы, направленные как на повышение уровня ЛПВП в плазме крови, так и на сохранение их нативных функциональных свойств. В качестве одного из ключевых критериев функциональности ЛПВП предлагается определять способность ЛПВП осуществлять отток холестерина из макрофагов. Исследования показали, что введение в организм реконструированных ЛПВП или пептидов-миметиков apoA-I ускоряет отток холестерина из периферических тканей, улучшает состояние эндотелия сосудов и приводит к регрессии атеросклеротической бляшки. Таким образом, терапия с использованием реконструированных ЛПВП и/или apoA-I-миметиков может стать эффективным способом лечения сердечно-сосудистых заболеваний, вызванных накоплением холестерина в сосудистой стенке. Поиск литературы проведен по базам данных: Scopus, Web of Science, MedLine, Pubmed, Consilium medicum, CyberLeninka, Pubfacts, MedBookAide, Mediasphera.ru, SpringerLink, BioMedSearch.com., ResearchGate.net., Google Scholar, РИНЦ.

Ключевые слова: атеросклероз; липопротеины высокой плотности; обратный транспорт холестерина; ингибиторы БПЭХ; рекомбинантные ЛПВП; apoA-I-миметики; обзор.

Для цитирования: Потеряева О.Н., Усынин И.Ф. Липопротеины высокой плотности: от количественных показателей к функциональной оценке и терапии (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (7): 381-390. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-381-390>

Для корреспонденции: Потеряева Ольга Николаевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. механизмов межклеточных взаимодействий; e-mail: olga_Poteryaeva@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 122032300152-3 с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ» (соглашение №075-15-2021-691)).

Поступила 14.12.2021

Принята к печати 25.01.2022

Опубликовано 18.07.2022

Poteryaeva O.N., Usynin I.F.

HIGH-DENSITY LIPOPROTEINS: FROM QUANTITATIVE MEASURES TO FUNCTIONAL ASSESSMENT AND THERAPY (REVIEW OF LITERATURE)

Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Fundamental and Translation Medicine, Novosibirsk, 630117, Russia

The antiatherogenic role of high-density lipoproteins (HDL) is associated primarily with their participation in the reverse transport of excess cholesterol from peripheral tissues to the liver. The efficiency of this mechanism depends on the ability of apolipoprotein A-I (apoA-I), the main protein component of HDL, to capture cholesterol from cells. It is known that the acceptor properties of this protein can change under the influence of various factors. This review discusses modern approaches aimed both at increasing the plasma level of HDL and preserving their native functional properties. As one of the key criteria of HDL functionality it is proposed to determine the ability of HDL to accept labeled cholesterol from macrophages. Studies have shown that injection of recombinant HDL or apoA-I mimetic peptides accelerates cholesterol efflux from peripheral tissues, improves vascular endothelial state, and leads to regression of atherosclerotic plaque. Thus, therapy with recombinant HDL/apoA-I may become an effective way to treat cardiovascular diseases caused by cholesterol accumulation in the vascular wall.

Key words: atherosclerosis; high-density lipoproteins; reverse cholesterol transport; CETP inhibitors; recombinant proteins; apoA-I mimetics.

For citation: Poteryaeva O.N., Usynin I.F. High-density lipoproteins: from quantitative measures to functional assessment and therapy (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (7): 381-390 (in Russ.). DOI:<https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-381-390>

For correspondence: Poteryaeva O.N., Dr. Sci. Med., lead researcher of the laboratory of intercellular interactions; e-mail: olga_Poteryaeva@mail.ru

Information about authors:

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

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

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

Acknowledgment. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (theme № 122032300152-3).

Received 14.12.2021

Accepted 25.01.2022

Published 18.07.2022

Введение. Фрамингемское исследование в 1986 г. было первым знаменательным событием, которое выявило положительную связь между ишемической болезнью сердца (ИБС) и низким уровнем липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Повышение холестерина (ХС) ЛПВП на 1 мг/дл (0,026 ммоль/л) ассоциируется со снижением риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) на 2-3% [1]. Концентрация ХС-ЛПВП считалась надёжным, независимым, обратным предиктором ССЗ. Его определение в сыворотке крови человека входит в список традиционных биомаркеров ССЗ [2]. Действительно, множество экспериментальных исследований подтверждают, что основная антиатерогенная функция ЛПВП связана с обратным транспортом холестерина (ОТХ), но кроме этого они обладают антиоксидантной, противовоспалительной, антитромботической и противоинфекционной функциями [3, 4]. ЛПВП увеличивают выработку оксида азота (NO), стимулируют пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, подавляют процессы воспаления и апоптоза в сосудистой стенке. Параоксоназа 1 (ПОН1), фермент, связанный с ЛПВП, отвечает за его антиоксидантные функции [5]. Обсуждаются антидиабетическая [6, 7] и кардиопротекторная функции ЛПВП [8].

Однако результаты эпидемиологических наблюдений, проведённые в последние годы с использованием менделевской рандомизации, показали, что связь между концентрацией ХС-ЛПВП и ССЗ довольно сложная и, на самом деле, не является линейной, а количество частиц ЛПВП не отражает их функциональное состояние [9, 10]. Растет количество литературных источников, указывающих на существование модифицированных, дисфункциональных и провоспалительных частиц ЛПВП, у которых нарушается способность к ОТХ, утрачиваются атеропротективные свойства [11, 12]. Замена основного белка ЛПВП – апо-липопротеина А-I (апоА-I) на провоспалительные белки, такие, как сывороточный амилоид А, комплемент 3 или липополисахарид-связывающий белок при системном хроническом воспалении сопровождается нарушением нативных функциональных свойств ЛПВП [13]. Парадоксальное повышение уровня апоА-I у некоторых больных сахарным диабетом (СД) 2 типа сопровождается окислительной модификацией белка с появлением у ЛПВП провоспалительных и проатерогенных свойств [14]. Было показано, что чрезвычайно высокая концентрация ХС-ЛПВП связана с возрастанием общей смертности. У мужчин и женщин с ХС-ЛПВП 2,5–2,99 ммоль/л отношение шансов по всем причинам смертности почти в два раза меньше, чем с ХС-ЛПВП $\geq 3,0$ ммоль/л [15].

Цель данного обзора – провести анализ современных технологий, направленных как на коррекцию уровня ЛПВП и апоА-I в плазме крови, так и на восстановление их нативных функциональных свойств.

Процесс обратного транспорта холестерина. Согласно современным представлениям, одной из причин развития атеросклероза является нарушение ОТХ, осуществляемого ЛПВП. В связи с этим считается, что эффективность оттока ХС на ЛПВП лучше отражает риск развития ССЗ, чем стандартные количественные показатели уровня ХС-ЛПВП [1, 8]. Высказано предположение, что терапевтические подходы, направленные на увеличение оттока ХС из атероматозной бляшки, будут способствовать её регрессии и приводить к снижению развития ИБС [16]. На рис. 1. представлена схема ОТХ (адаптировано из [17]).

Процесс ОТХ начинается с переноса свободного ХС из нагруженных липидами макрофагов (перифери-

ческих клеток) в дисковидную частицу пре- β 1-ЛПВП, которая синтезируется в печени и кишечнике из апоА-I с добавлением фосфолипидов. Частицы пре- β 1-ЛПВП захватывают свободный ХС с клеточных мембран через АТФ-связывающий кассетный транспортёр А1 (ABCA1), превращаясь в α 4-ЛПВП (рис. 1, путь А). Созревая, такие частицы захватывают ещё больше свободного ХС из клеток (включая макрофаги) через ABCG1 (рис. 1, путь В). Далее свободный ХС превращается в сложные эфиры ХС под действием фермента лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ), который добавляет жирную кислоту от фосфатидилхолина к свободному ХС с образованием сферических плотных и мелких α 3-ЛПВП частиц (рис. 1, путь С).

По мере захвата новых молекул ХС и их этерификации ЛПВП увеличиваются в размере, постепенно трансформируясь в зрелые α 2- и α 1-ЛПВП. Часть эфиров ХС при помощи белка-переносчика эфиров ХС (БПЭХ) переходит в апоВ-содержащие липопротеины в обмен на триглицериды (рис. 1, путь Е). Зрелые частицы α -ЛПВП через сквенджер-рецептор В1 (SR-B1) доставляют эфиры ХС в печень (рис. 1, путь D), где они снова преобразуются в свободный ХС, который в составе желчных кислот выделяется в кишечник. Потенциальным маркером усиления ОТХ является повышение ХС в кале. АпоВ-содержащие ЛП (ЛПНП, ЛПОНП), обогащенные эфирами ХС, через рецептор липопротеинов низкой плотности (LDL-R) также захватываются гепатоцитами (рис. 1, путь F). Ранее предполагали, что зрелые, крупные α -ЛПВП частицы обладают большей защитной активностью и связаны с уменьшением сердечно-сосудистого риска [18]. Однако последние данные опровергают эту концепцию. Ниацин или ингибиторы белка, БПЭХ, при добавлении к терапии статинами не обеспечили значимого снижения ССЗ, несмотря на повышение ХС-ЛПВП (ингибиторы БПЭХ и ниацин повышают преимущественно уровень крупных частиц ЛПВП). Перегруженные холестерином ЛПВП становятся функционально аномальными, что оказывает негативное влияние на отток ХС из периферических тканей и/или снижает их селективное поглощение рецептором SR-B1 в печени. Это приводит к потере атеропротективной функции ЛПВП и повышению риска ССЗ [19]. С другой стороны, мелкие плотные частицы ЛПВП являются более функциональными, эффективнее осуществляют захват ХС из нагруженных липидами макрофагов и проявляют более мощную антиоксидантную, провоспалительную и цитопротекторную активность по сравнению с крупными частицами [19, 20].

Исследованиями последних лет было показано, что физические нагрузки и значительное снижение избыточной массы тела улучшают функциональные свойства ЛПВП; в первую очередь, за счёт ускорения ОТХ, осуществляемого при увеличении концентрации апоА-I, активности ферментов (ЛХАТ, липопротеинлипазы), экспрессии АТФ-связывающих кассетных транспортеров ABCA1, ABCG1 и ядерных факторов PPAR, участвующих в этом процессе. Физические нагрузки и диета повышают антиоксидантную способность ЛПВП и активность ПОН-1 [18,21].

В настоящее время ведутся активные исследования по поиску новых стратегий, которые могли бы улучшить обратный транспорт ХС, повысить функциональность ЛПВП и потенциально снизить сердечно-сосудистый риск. Среди таких стратегий изучаются ингибито-

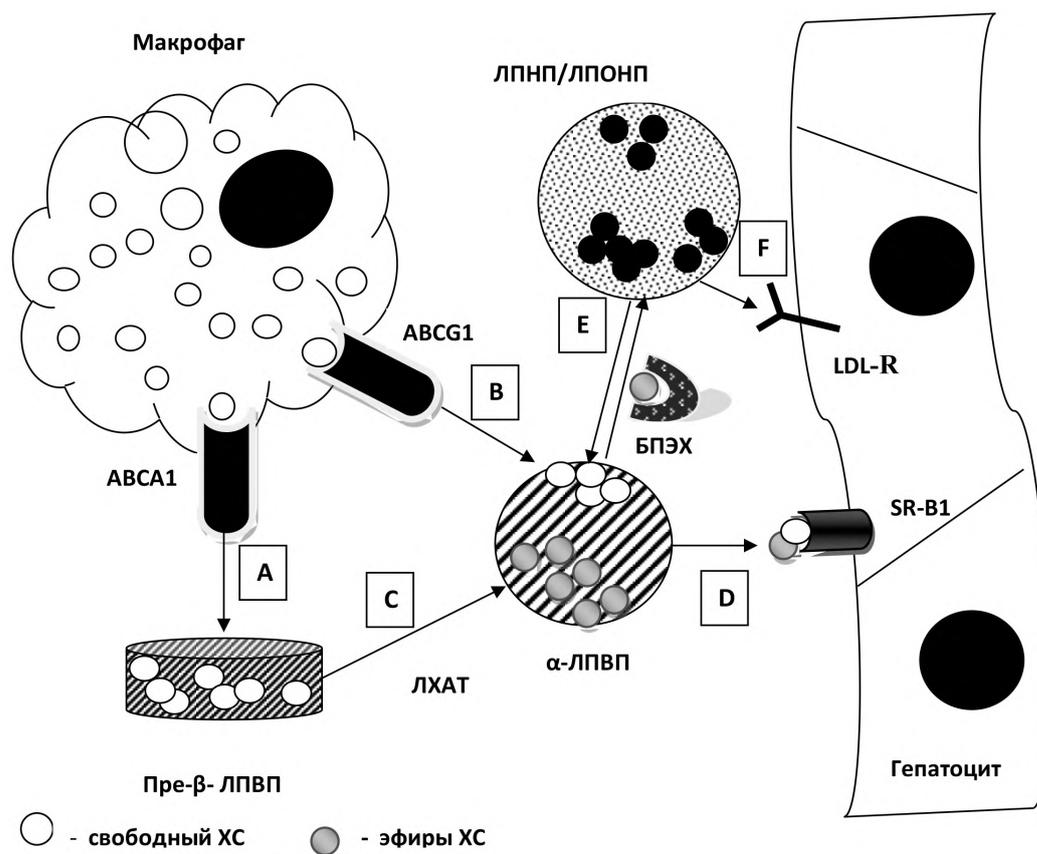


Рис. 1. Механизм обратного транспорта холестерина (адаптировано из [17]).

ры БПЭХ; увеличение уровня апоА-I при воздействии рекомбинантных (реконструированных) ЛПВП или пептидов-миметиков апоА-I. Улучшение функциональности ЛПВП оказалось сложной задачей.

Ингибиторы БПЭХ. БПЭХ – гидрофобный гликопротеин с молекулярной массой 74 кДа; синтезируется в печени и оттуда попадает в кровь, где, в основном, связан с ЛПВП. БПЭХ участвует в двустороннем переносе эфиров ХС и триглицеридов между липопротеинами (см. рис.1). БПЭХ представляет собой асимметричный белок в форме банана, образующего мост между ЛПВП, ЛПНП или ЛПОНП. N-терминальный домен БПЭХ проникает в ЛПВП, а C-концевой домен взаимодействует с ЛПНП/ЛПОНП, соединяя их в тройной комплекс, приводящий к его конформационному изменению, в результате чего формируется гидрофобный туннель, по которому эфиры ХС переносятся из ЛПВП в ЛПНП [22].

Основным эффектом ингибирования БПЭХ является снижение скорости передачи эфиров ХС из ЛПВП в липопротеины, богатые триглицеридами, что приводит к увеличению содержания эфиров ХС в ЛПВП и образованию более крупных, медленно катаболизирующих частиц. Антиатерогенный эффект ингибирования БПЭХ подтверждается большинством экспериментальных исследований. Ингибирование БПЭХ или нокаутирование гена БПЭХ у кроликов (животные, которые естественным образом экспрессируют БПЭХ) неизменно приводило к снижению выраженности атеросклероза аорты и коронарных артерий даже при кормлении пищей с

высоким содержанием ХС [23]. Генетический полиморфизм, обуславливающий низкий уровень или активность БПЭХ, сопровождается более высокой концентрацией ХС-ЛПВП, а также более низкой концентрацией ХС-ЛПНП в крови, при этом снижается риск развития ИБС [1]. Это послужило основанием для разработки лекарственных препаратов, относящихся к классу ингибиторов БПЭХ, применение которых, как предполагалось, может привести к снижению риска развития осложненной ССЗ [2, 23, 24]. Структура ингибиторов БПЭХ, их фармакокинетика и фармакодинамика подробно представлены в обзоре N. Ferri и соавт. [22].

Четыре препарата, ингибиторы БПЭХ, проходили испытания III фазы, но результаты двух из них – дальцептрапиба и торцептрапиба – были отрицательными. В исследовании ILLUMINATE у пациентов (15 067 человек), принимающих торцептрапиб, уровень ХС-ЛПВП повышался примерно на 70%, апоА-I на 25%, а концентрация ХС-ЛПНП снижалась на 20% и более. Однако торцептрапиб не продемонстрировал благоприятного влияния на объем атеромы и регресс атеросклероза, оцениваемые по толщине интимы сонных артерий при внутрисосудистом ультразвуковом исследовании (ВСУЗИ). Испытание было преждевременно прекращено из-за нарушения у пациентов электролитного состава крови, увеличения концентрации альдостерона и повышения артериального давления. Также наблюдали учащение сердечных приступов, увеличивалось количество смертей от рака и инфекций по сравнению с контрольной группой, получающей аторвастатин [25].

Предположили, что одной из возможных причин провоспалительного эффекта торцетрапиба является значительное повышение содержания апоС-III в ЛПВП, который стимулирует адгезию моноцитов к эндотелиальным клеткам и выработку медиаторов воспаления [26].

Эффективность дальцетрапиба была оценена в программе Dal-HEART, состоящей из пяти крупных исследований [22]. В исследовании Dal-OUTCOMES, в котором приняли участие 15 871 пациент, терапия дальцетрапибом способствовала повышению уровня ХС-ЛПВП, но без существенного влияния на ХС-ЛПНП или аполипопротеин В (апоВ). Дальцетрапиб не снижал риск осложнений и смертность от ССЗ, несмотря на отсутствие побочных эффектов по сравнению с торцетрапибом. Испытание dal-OUTCOMES было прекращено досрочно из-за очевидной неэффективности препарата. Дальцетрапиб оказался самым слабым из ингибиторов БПЭХ [27]. Однако, в дальнейшем, с помощью фармакогеномного подхода обнаружили четкие межиндивидуальные различия в ответах на далцетрапиб. Пациенты с генотипом AA по rs1967309 в гене ADCY9 (аденилатциклаза 9) имели снижение риска возникновения сердечно-сосудистых событий на 39% при лечении далцетрапибом по сравнению с плацебо, у пациентов с генотипом GG риск повышался на 27%, гетерозиготы (AG) показали нейтральный результат. С помощью ВСУЗИ было продемонстрировано уменьшение толщины интима-медиа сонной артерии у пациентов с протективным генотипом AA. Более того, в группе с генотипом AA снижался уровень С-реактивного белка и увеличивался ОТХ [28]. Фармакогеномные исследования продолжаются.

В исследовании NCT01105975 фазы 2 изучали эффективность мощного ингибитора БПЭХ – эвациетрапиба. Результаты показали, что по сравнению с плацебо, эвациетрапиб в качестве монотерапии или в комбинации со статинами, повышал уровень ХС-ЛПВП (+132%) и апоА-I (+49%); и снижал ХС-ЛПНП (-36%). В качестве монотерапии эвациетрапиб дозозависимо также снижал уровень триглицеридов, ХС-ЛПНП(-37%), Lp(a) (-22%), апоВ (-12%). Однако, в клиническом исследовании фазы 3 (ACCELERATE) у 12 092 пациентов с высоким риском ИБС, несмотря на улучшение липидных показателей, не было отмечено снижения сердечно-сосудистых событий. Исследование было остановлено через два года [29, 30].

В рандомизированном контролируемом исследовании фазы 2 изучали действие еще одного ингибитора БПЭХ – анацетрапиба [31]. Было показано, что у пациентов с атеросклеротическим поражением сосудов, ежедневный прием анацетрапиба в течение 8 недель, в присутствии или отсутствии 20 мг аторвастатина, повышал уровень ХС-ЛПВП и апоА-I. При этом уровень ХС-ЛПНП снижался на 40%, а в комбинации с аторвастатином на 70% по сравнению с плацебо. Аналогичные результаты были получены в исследовании III фазы (DEFINE), в котором приняли участие 1623 пациента с высоким риском развития ИБС, получающие лечение статинами. Исследование продолжалось в течение двух лет. Анацетрапиб в дозе 100 мг повышал уровень ХС-ЛПВП на 140%, снижал содержание ХС-ЛПНП примерно на 40%, апоВ – на 17% и Lp(a) – на 25%, соответственно. Лечение анацетрапибом продолжительностью два года было безопасным, не наблюдалось клинически важных отклонений в показателях печеночных ферментов, артериального давления, электролитов или других нежелательных явлений [32].

В исследовании REVEAL [33] приняли участие 30 449 пациентов, оценку эффективности и безопасности анацетрапиба исследовали на протяжении 4-х лет. За время лечения не наблюдали побочных эффектов, таких, как снижение когнитивной функции, депрессия, повышение заболеваемости раком или инфекционными болезнями. Повышение артериального давления и снижение скорости фильтрации были не такими значительными по сравнению с предыдущими препаратами. При этом анацетрапиб показал умеренное снижение основных сердечно-сосудистых осложнений (примерно 10%) уже в течение первого года лечения и значительное снижение в течение 4-х лет по сравнению с плацебо. Определить механизм снижения риска основных коронарных событий анацетрапибом в этом испытании не удалось [22]. Некоторые исследователи связывают достигнутые преимущества с сопутствующим снижением ХС-ЛПНП, апоВ и Lp(a), чем с повышением ХС-ЛПВП [34]. Кроме того, экспериментально было показано, что анацетрапиб снижает плазменные уровни PCSK9, одного из основных регуляторов рецепторов ЛПНП [22].

Однако, нельзя полностью исключить вклад анацетрапиба в улучшение функциональных свойств ЛПВП. Так, у лиц, получавших анацетрапиб, ЛПВП повышались в 1,5–2 раза ОТХ из макрофагов, перегруженных ХС [23]. Другие ингибиторы БПЭХ, эвациетрапиб и ТА-8995 увеличивали скорость ОТХ на 34% и 50%, соответственно. Отмечено, что при приеме ингибиторов ЛПВП сохраняют свои противовоспалительные и антиоксидантные свойства [3, 22]. Ингибиторы БПЭХ оказались более эффективными в качестве монотерапии, чем при комбинированном использовании со статинами [29]. Как оказалось, использование статинов снижает экспрессию транспортёров ABCA1 и ABCG1 в макрофагах [23].

Важным положительным эффектом при использовании ингибиторов БПЭХ является снижение частоты новых случаев диабета примерно на 10% и улучшение гликемического контроля у пациентов с СД 2 типа [23]. При комбинировании аторвастатина и торцетрапиба наблюдали не только повышение уровня ХС-ЛПВП и апоА-I в плазме крови, но и снижались концентрации глюкозы, инсулина, гликированного гемоглобина HbA1c и индекс инсулинорезистентности (НОМА-IR) [35]. Механизмы, лежащие в основе положительных эффектов ингибиторов БПЭХ у пациентов с диабетом, недостаточно изучены, предполагают, что они напрямую связаны с повышением уровня ЛПВП [23,35]. Известно, что ЛПВП обладают потенциальными противодиабетическими свойствами: увеличивают поглощение глюкозы скелетными мышцами, стимулируют синтез и секрецию инсулина б-клетками поджелудочной железы; улучшают дисфункцию островков с помощью ингибирования апоптоза б-клеток [7]. Следовательно, ингибиторы БПЭХ могут предотвращать продиабетогенное действие статинов и ниацина [36].

Таким образом, дальнейшее изучение и восстановление функциональных свойств ЛПВП при помощи ингибирования БПЭХ оправдано. Дальнейшая разработка ингибиторов БПЭХ продолжается, в том числе, с помощью фармакогеномного подхода.

Реконструированные ЛПВП. Прямое увеличение концентрации апоА-I с низким содержанием липидов в крови, представляет собой наиболее проверенное терапевтическое средство, связанное с антиатерогенным по-

тенциалом ЛПВП. Влияние фосфолипидных комплексов апоА-I с низким содержанием липидов, так называемых реконструированные ЛПВП (рЛПВП), ранее были изучены в экспериментальных моделях на животных. Трансгенное увеличение апоА-I или внутривенное введение рЛПВП способствовали усилению ОТХ из макрофагов и выраженной регрессии атеросклероза у мышей и кроликов [3,37,38].

Одним из первых рЛПВП изучали влияние препарата CSL-111, представляющего собой комплекс нативного апоА-I с соевым лецитином. Использование ВСУЗИ у пациентов с атеросклеротическим поражением периферических артерий нижних конечностей выявило, что даже однократное внутривенное введение препарата (80 мг/кг в течение 4 ч) через 5–7 дней приводит к значительному снижению ХС, размеров макрофагов и медиаторов воспаления (VCAM-1) в бляшках [39]. Хотя исследование включало только небольшое количество участников ($n=20$), результат подтверждал кардиопротективный эффект ЛПВП и явился мощным стимулом для проведения большего количества исследований. Было доложено о благоприятном действии четырёх еженедельных инфузий CSL-111 в дозе 40 мг/кг у пациентов ($n=111$) с коронарным атеросклерозом. Хотя введение CSL-111 не приводило к статистически значимому уменьшению объёма атеромы, но значительно улучшало показатели состава бляшек по оценке ВСУЗИ [34,40]. Статистически значимое уменьшение объёма атеромы по сравнению с исходным уровнем было продемонстрировано у 145 пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) при действии четырёх еженедельных инфузий CSL-111 по 40 или 80 мг/кг (исследование ERASE). Для сравнения: суточные дозы правастатина 40 мг или 40–80 мг ловастатина в течение двух лет замедляли прогрессирование коронарного атеросклероза по оценке ВСУЗИ в той же степени, что и через 4 недели лечения CSL-111 [8]. У больных после атеротромботического инсульта или острого инфаркта миокарда было описано снижение уровня или невозможность мобилизации эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), что ассоциировалось с рецидивом сердечно-сосудистых осложнений и повышением смертности [41]. У пациентов с ОКС четыре еженедельные инфузии по 40 мг/кг CSL-111 значительно увеличивали количество ЭПК, экспрессирующих CD34⁺; снижали апоптоз прогениторных клеток и повышали миграцию клеток из костного мозга в места повреждения сосудов, что приводило к восстановлению эндотелия и неоваскуляризации [42].

В настоящее время проводятся клинические исследования усовершенствованной формулы CSL-111, так называемой CSL-112. В плацебо-контролируемом исследовании фазы 2b было показано, что пациенты с острым инфарктом миокарда хорошо переносят 4 еженедельные внутривенные инфузии CSL112, не отмечалось значительных изменений функции печени или почек. CSL112 при введении в кровь подвергается ремоделированию, которое включает временное их слияние с эндогенными ЛПВП и быстрое расщепление с образованием множества пре- β 1-ЛПВП частиц, содержащих апоА-I с низким содержанием липидов. В группе, получавшей CSL112, наблюдалось увеличение уровня пре- β 1-ЛПВП в 17 раз через два часа после введения препарата, при этом ёмкость ОТХ увеличивалась в 2–3 раза [43]. У пациентов со стабильным атеросклерозом внутривенное введение CSL-112 в четыре раза увеличивало ABCA1-опосредованный отток ХС [44].

Компанией “Cerenis Therapeutics” предложены рЛПВП (CER-001), представляющие собой модифицированные, отрицательно заряженные липопротеиновые частицы, содержащие рекомбинантный человеческий апоА-I и природные фосфолипиды (97% сфингомиелин и 3% дипальмитоилфосфатидилглицерин, в молярном соотношении 32,3:1). Частицы CER-001 синтезируются с тем же отрицательным зарядом, что и нативные пре- β -ЛПВП. Это предотвращает слияние частиц и способствует более быстрой и устойчивой мобилизации ХС из атеросклеротической бляшки [45]. У мышей (-LDL-R), находящихся на диете с высоким содержанием ХС, CER-001 способствовал усилению ОТХ [46]. У пациентов с семейной гипо- α -липопротеинемией терапия CER-001 приводила не только к увеличению содержания ХС-ЛПВП, но и ускоряла отток ХС, что приводило к увеличению его выведения с калом. Кроме того, было обнаружено значительное снижение активности воспаления в аортальных и каротидных бляшках, уменьшение толщины сосудистой стенки атеросклеротических артерий [47]. Аналогичный эффект был получен у пациентов с гомозиготной семейной гиперхолестеринемией [48]. Препарат CER-001 был протестирован с помощью магнитно-резонансной томографии сонных артерий у 23 пациентов с генетическими мутациями по LDL-R, apoB, PCSK9. Кроме увеличения уровня апоА-I после инфузий CER-001 наблюдали уменьшение размеров бляшки [48].

У здоровых добровольцев шесть еженедельных инфузий CER-001 в дозе 3 мг/кг способствовали увеличению содержания ХС в циркулирующих частицах ЛПВП, а у пациентов с ОКС приводили к снижению общего объёма атеромы по сравнению с плацебо [49]. В другом исследовании, введение CER-001 (10 еженедельных инъекций CER-001 по 3 мг/кг) пациентам с ОКС не выявило статистической значимости в уменьшении объёма атеросклеротической бляшки по сравнению с плацебо по данным ВСУЗИ [50]. Однако анализ, проведенный с акцентом на анатомически подобранные артериальные сегменты с подходящим качеством изображения, продемонстрировал регрессию атеромы (-6.28 против -3.63 мм³) [45]. Более благоприятное воздействие на состав или регрессию бляшек оказывали инфузии CER-001 у пациентов с ОКС с базовым процентным объемом атеромы больше 30% по данным ВСУЗИ [51].

Недавно была апробирована новая форма рЛПВП, названная тетранектин-апоА-I (ТН-апоА-I), созданная путем слияния трёх молекул апоА-I с доменом белка тетранектина человека. В качестве фосфолипидов были выбраны 1-пальмитоил-2-олеил-фосфатидилхолин и 1,2-дипальмитоил-фосфатидилхолин в различных соотношениях. ТН-апоА-I не фильтруется клубочками и, следовательно, имеет более длительный период полувыведения, что потенциально повышает его эффективность. Показано, что ТН-апоА-I стимулирует ОТХ, активирует ЛХАТ и оказывает противовоспалительный эффект [37]. У кроликов даже однократная внутривенная инфузия ТН-апоА-I способствовала стабилизации атеросклеротических поражений за счёт значительного снижения миграции моноцитов и содержания макрофагов в бляшках сонных артерий. Умеренная регрессия атеросклеротических поражений также была достигнута при использовании пяти инфузий ТН-апоА-I в разных дозах (8, 40 и 100 мг/кг). Для сравнения, подобный эффект оказывают статины после их приёма в высоких дозах в течение 18–24 месяцев. Количественная оценка ОТХ образцов плазмы кро-

ликов, проводимая на линии мышинных макрофагов J774, показала, что ТН-апоА-I вызывают заметное увеличение оттока ХС через ABCA1-опосредованный путь. Кроме того, введение рЛПВП значительно снижало эндотелиальную экспрессию молекул клеточной адгезии (VCAM-1, ICAM-1 и MCP-1), проявляя противовоспалительный эффект и оказывая защитное действие на эндотелиальные клетки [37]. Предполагают, что рЛПВП индуцируют антиоксидантный белок 24-дегидрохолестеринредуктазу (DHCR24), который подавляет активацию ядерного фактора kB (NF-kB) и снижает уровень белка VCAM-1 в эндотелиальных клетках [52]. Механизм ингибирования воспаления в эндотелиальных клетках представлен на рис.2 (адаптировано из [52]), рЛПВП увеличивают экспрессию белка DHCR24, что приводит к активации PI3K/Akt сигнального пути и индукции гемоксигеназы-1 (HO-1), нейтрализующей активные формы кислорода (АФК).

Большой интерес представляют рЛПВП, содержащие апоА-I *Milano*, который отличается от апоА-I дикого типа заменой аминокислоты аргинин на цистеин в положении 173 и характеризуется более длинным периодом полураспада. Мутация апоА-I *Milano* впервые обнаружена в когорте итальянцев с низкой распространенностью атеросклероза, несмотря на очень низкий уровень ХС-ЛПВП (0,26-0,52 ммоль/л). Комплекс апоА-I *Milano*

с фосфолипидом (1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин) известен как ЕТС-216 [53]. Внутривенное введение ЕТС-216 приводило к значительному снижению содержания липидов в атероматозной бляшке и вызывало быструю и значительную регрессию атеросклероза у кроликов и мышей [8]. Ввиду эффективности рЛПВП с апоА-I *Milano* было высказано предположение, что его разработка может быть ключевым фактором в терапии ИБС. В связи с этим изучали препарат MDCO-216 – стандартизированный рЛПВП, содержащий рекомбинантный апоА-I *Milano*, в качестве фосфолипидной основы – димиристоилфосфагидилхолин (DMCO). Внутривенное введение пяти еженедельных инфузий MDCO-216 (он же ЕТС-216) в дозе 15 мг/кг пациентам (n=123) с ОКС приводило к значительному снижению объема атеромы и средней максимальной толщины коронарных сосудов по данным ВСУЗИ [8, 54]. В некоторых исследованиях, проведенных в больницах Канады и Европы, введение стандартизированного рЛПВП, содержащего апоА-I *Milano* (MDCO-216) у пациентов с ОКС, не приводило к регрессии атеросклеротических бляшек и выраженному положительному эффекту на снижение риска ССЗ [50].

Успешной оказалась генная терапия с использованием рекомбинантного аденоассоциированного вирусного вектора (rAAV), экспрессирующего апоА-I *Milano*. У апоА-I/

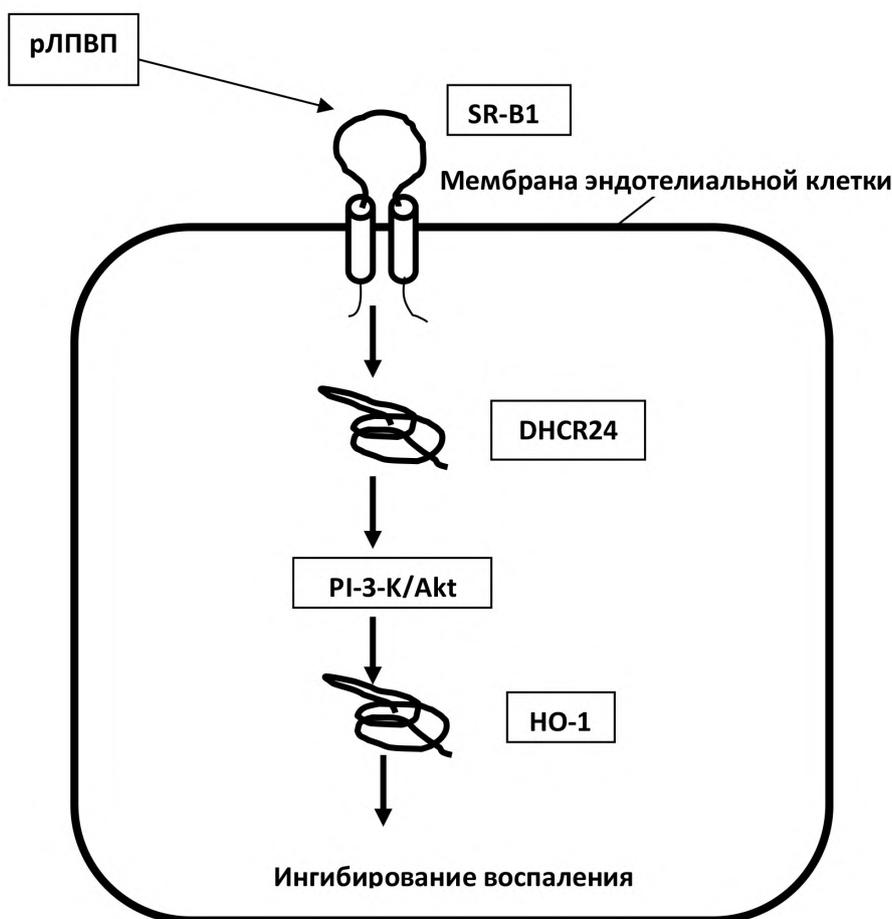


Рис. 2. Механизм участия рЛПВП в активации сигнальных путей, приводящих к ингибированию воспаления в стенке сосудов (адаптировано из [52]).

PI-3-K – фосфатидилинозитол-3-киназа; Akt – Akt-киназа или протеинкиназа B.

апоЕ – нокаутных мышей при использовании диеты с высоким содержанием ХС в течение 20 нед после однократной инъекции gAAV наблюдали значительную регрессию атероматозных бляшек по всей аорте, в синусах аорты и брахиоцефальных артериях по сравнению с мышами контрольной группы с пустым вектором, или мышами, получавшими гиполипидемическую диету. Было показано, что если снижение ХС, опосредованное диетой, способно остановить прогрессирование атеросклероза, то генная терапия gAAV 8 вызывает его регресс [55].

Другой подход к генной терапии заключался в трансдукции хелпер-зависимого аденовирусного вектора, экспрессирующего апоА-I (HdAd apoA-I), в эндотелиальные клетки артерий. Через 24 недели у кроликов, находящихся на диете с высоким содержанием жира, в обработанных с HdAd apoA-I сонных артериях объём поражения интимы сосудов был на 30% меньше, наблюдалось значительное снижение макрофагов и маркеров воспаления (VCAM-1, ICAM-1, MCP-1 и TNF-α) по сравнению с артериями, получавшими пустой вектор [56]. Кроме того, сообщалось, что наряду с повышением концентрации апоА-I, происходила одновременная сверхэкспрессия транспортёра ABCA1, которая повышала отток ХС [57]. Использование аденовирусного рекомбинантного апоА-I *Milano*, введенного с помощью переноса генов в стенку артерий или его иммобилизация на поверхности стента в экспериментальных моделях подавляла образование новых очагов атеромы, агрегацию тромбоцитов, снижала воспаление и риск развития

тромбоза при стентировании сосуда [8]. Эти программы продолжают проходить клинические испытания.

Пептиды-миметики apoA-I. Пептиды-миметики apoA-I представляют собой искусственно синтезированные пептиды, которые обладают биологическими свойствами нативного apoA-I. Среди пептидов-миметиков наиболее изученным и эффективным препаратом является D-4F, состоящий из 18 аминокислот, включая 4 остатка фенилаланина (F). Данный пептид не разрушается пищеварительными ферментами и способен проникать в плазму при пероральном приёме [58,59]. Показано, что D-4F проявляет антиатерогенные эффекты, подобно нативным ЛПВП: ускоряет образование пре-β-ЛПВП, повышает ОТХ, увеличивает экспрессию эндотелиальной синтазы NO (eNOS) и продукцию NO, подавляет развитие окислительного стресса. Механизм антиоксидантного действия D-4F связан с экспрессией индуцибельного фермента HO-1, который нейтрализует АФК, образованные NADPH-оксидазой под влиянием окисленных ЛПНП (ок-ЛПНП). Активация данного сигнального пути предотвращает воспаление и апоптоз в эндотелиальных клетках и способствует восстановлению эндотелия. D-4F, ингибируя экспрессию молекул адгезии и хемотаксический фактор моноцитов-1 (MCP-1), способствует миграции и репарации эндотелиальных клеток [60]. Механизм действия D-4F представлен на рис. 3. (адаптировано из [60]).

Окисленные ЛПНП (ок-ЛПНП), проникая через рецептор окЛПНП (LOX-1) в эндотелиальную клетку, ак-

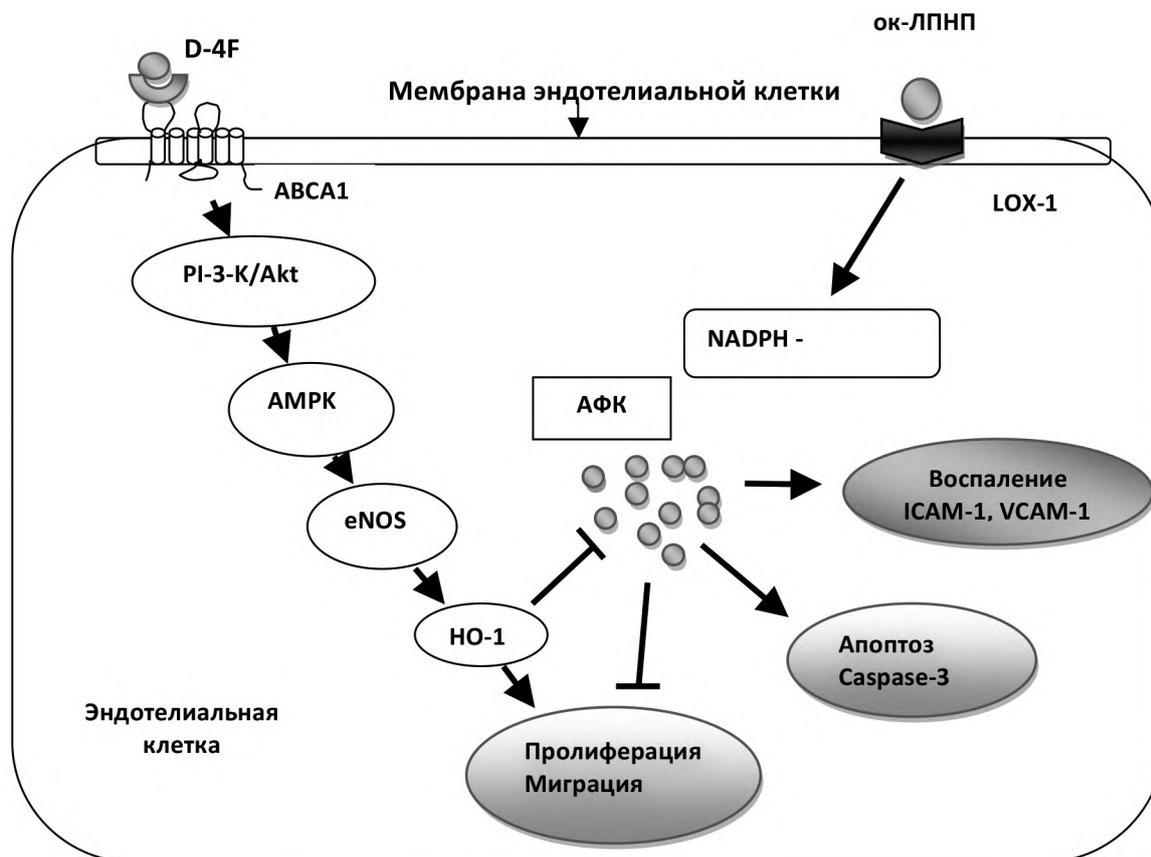


Рис.3. Механизм защитного действия синтетического миметика апоА-I (D-4F) в эндотелиальной клетке (адаптировано [60]).
Объяснение в тексте.

тивируют NADH-оксидазу, основной источник генерации АФК, что приводит к воспалению, усиливает апоптоз, снижает процессы регенерации и пролиферации. Пептид-миметик апоА-I, оказывая своё действие через транспортер ABCA1, активирует сигнальные пути PI-3-K/Akt, AMP-активируемую протеинкиназу (АМРК) и увеличивает экспрессию eNOS и продукцию NO. Последний активирует экспрессию фермента HO-1, который способствует пролиферации и миграции эндотелиальных клеток, предотвращает воспаление и апоптоз, что в итоге способствует восстановлению функций эндотелия. Кроме того, HO-1 обладает кардиопротекторным действием [60].

В экспериментальных исследованиях было показано, что у крыс в мышинной модели инфаркта миокарда, D-4F снижал уровень общего ХС, ХС-ЛПНП, триглицеридов, повышал уровень ХС-ЛПВП. При этом уменьшилась площадь ишемии миокарда, был минимизирован почечный и сердечный апоптоз, сберегались митохондрии, наблюдалось усиление процессов неоваскуляризации. Таким образом, D-4F предотвращал сердечную и почечную дисфункцию после инфаркта миокарда [61].

D-4F ингибировал эпителиально-мезенхимальный переход, индуцированный трансформирующим фактором роста b1 (TGF-b1) в человеческой линии альвеолярных эпителиальных клеток II типа A549 [62]. D-4F значительно снижает онкогенность миелоидных супрессорных клеток, подавляя их дифференцировку и препятствуя накоплению в селезенке и опухолевой ткани мыши, что приводило к снижению производства АФК и H_2O_2 этими клетками и увеличению пролиферации Т-клеток, секреции интерферона γ [63]. Доклинические исследования предполагают, что миметики апоА-I могут служить новым безопасным, терапевтическим средством для лечения ряда онкологических заболеваний [64].

RVX-208, также небольшая синтетическая молекула, известная как RVX000222, разработанная в лаборатории "Resverlogix Corporation" (Калгари, АВ, Канада) для лечения ОКС, атеросклероза и болезни Альцгеймера. Пероральный препарат RVX-208 избирательно активирует ядерный фактор транскрипции, который увеличивает печеночную и кишечную продукцию апоА-I. В клетках HepG2 препарат RVX-208 индуцировал синтез мРНК апоА-I и белка, что приводило к повышению уровня пре- β -ЛПВП и α -ЛПВП [65]. У африканских зеленых обезьян, получавших RVX-208 в течение двух месяцев, в сыворотке крови повышался уровень апоА-I и ЛПВП на 57 и 92%, соответственно. При этом инкубация макрофагов в присутствии сыворотки крови этих животных усиливала ОТХ [66]. Результаты клинического исследования Ib/IIa фазы демонстрируют безопасность и хорошую переносимость RVX-208. К сожалению, у пациентов с ИБС, в отличие от обезьян, не выявлено значительного увеличения уровня апоА-I даже при назначении высокой дозы RVX-208. Кроме того, высокие дозы препарата повышали уровень сывороточных трансаминаз в три раза. Обнадёживающим результатом в данном исследовании было обнаруженное улучшение ОТХ (примерно на 20%) за счет ускоренного созревания ЛПВП [67].

Таким образом, повышение уровня апоА-I при внутривенном введении рЛПВП или пептидов-миметиков оказывает положительное влияние на ОТХ, функции эндотелия и регрессию атеросклеротической бляшки. Предполагается, что улучшение функций эндотелия под

влиянием апоА-I происходит через активацию внутриклеточных сигнальных путей, связанных с регуляцией воспалительного ответа и апоптоза.

Заключение. Установлено, что реконструированные ЛПВП и апоА-I обладают мощным атеропротекторным действием: уменьшают размер атеромы, снижают количество маркёров воспаления сосудистой стенки, увеличивают ОТХ. Однако до сих пор остаются спорные и нерешенные вопросы в отношении клинического использования рекомбинантных белков. Так, использование апоА-I ограничено из-за большой молекулярной массы белка, его дорогостоящего производства и требований к очистке. В этом отношении генная терапия может представлять собой альтернативный подход для восстановления нормального уровня апоА-I в плазме крови.

Исследованиями последних лет показано, что в патогенезе атеросклеротических поражений сосудов значительная роль принадлежит дисфункциональным ЛПВП, которые в процессе модификации теряют свои антиатерогенные, антиоксидантные и противовоспалительные свойства. В связи с этим, актуальной задачей является разработка средств, эффективно восстанавливающих функциональные свойства ЛПВП. При этом в качестве одного из ключевых критериев функциональности ЛПВП предлагается определять эффективность ЛПВП осуществлять отток ХС из макрофагов.

Недавно на экспериментальной модели атеросклероза было продемонстрировано, что эффективность защитного действия рекомбинантного апоА-I существенно зависит от стадии развития атеросклероза. Оказалось, что атеропротекторные эффекты апоА-I проявляются при его введении животным только на ранней стадии атерогенеза [68]. По мнению авторов, экспериментальные результаты позволяют объяснить отсутствие выраженных эффектов рекомбинантного ЛПВП/апоА-I при клинических испытаниях на пожилых пациентах с прогрессирующим атеросклеротическим заболеванием.

Таким образом, инфузионная терапия с использованием реконструированных ЛПВП и/или апоА-I-миметиков может стать эффективным способом лечения сердечно-сосудистых заболеваний, вызванных накоплением ХС в сосудистой стенке. Однако, для оценки безопасности и эффективности этих подходов необходимы дополнительные клинические испытания.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-6, 8,9, 12-19, 22-68 см. REFERENCES)

- Потеряева О.Н., Усынин И.Ф. Антидиабетическая роль липопротеинов высокой плотности. *Биомедицинская химия*. 2018; 64(6): 463-71. DOI: 10.18097/PBMC20186406463.
- Перова Н.В. Атеромаркеры липопротеинов высокой плотности. Ч. II. Липопротеины высокой плотности: структура, состав, физико-химические и физиологические антиатерогенные свойства, их механизмы и маркеры (обзор литературы). *Профилактическая медицина*. 2017; 20 (4): 37-44. DOI: 10.17116/profmed201720437-44.
- Торховская Т.И., Кудинов В.А., Захарова Т.С., Маркин С.С. Дисфункциональные липопротеины высокой плотности: роль в атерогенезе и потенциальные мишени для фосфолипидной терапии. *Кардиология*. 2018; 58(3): 73-83. DOI: 10.18087/cardio.2018.3.10101.
- Метельская В.А. Функциональная многогранность липопротеинов высокой плотности: поиск золотой середины. *Атеросклероз*. 2021; 17(2): 61-71. DOI: 10.52727/2078-256X-2021-17-2-61-71.
- Потеряева О.Н., Усынин И.Ф. Терапевтические подходы к восстановлению антиатерогенной функции липопротеинов высоко-

кой плотности. *Якутский медицинский журнал*. 2021; 75(3): 98-103. DOI: 10.25789/YMJ.2021.75.25.

REFERENCES

1. Kajani S., Curley S., McGillicuddy F.C. Unravelling HDL-Looking beyond the cholesterol surface to the quality within. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(7): E1971. DOI: 10.3390/ijms19071971.
2. Jomard A., Osto E. High density lipoprotein: metabolism, function, and therapeutic potential. *Front. Cardiovasc. Med.* 2020; 7(39):1-12. DOI: 10.3389/fcvm.2020.00039.
3. Barter P.J., Rye K.A. Targeting High-density Lipoproteins to Reduce Cardiovascular Risk: What Is the Evidence? *Clin Ther.* 2015; 37(12): 2716-2731. DOI: 10.1016/j.clinthera.2015.07.021.
4. Brites F., Martin M., Guillas I., Kontush A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clin.* 2017; 8: 66-77. DOI:10.1016/j.bbacli.2017.07.002.
5. Soran H., Schofield J.D., Durrington P.N. Antioxidant properties of HDL. *Front. Pharmacol.* 2015; 6: 222. DOI: 10.3389/fphar.2015.00222.
6. Hou L., Tang S., Wu B.J., Ong K.L., Westerterp M., Barter P.J. et al. Apolipoprotein A-I improves pancreatic β -cell function independent of the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *FASEB J.* 2019; 33(7): 8479-89. DOI: 10.1096/fj.201802512RR.
7. Poteryaeva O.N., Usynin I.F. Antidiabetic role of high density lipoproteins. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2019; 13(2): 113-21. DOI: 10.1134/S1990750819020070. (in Russian)
8. Sirtori C.R., Ruscica M., Calabresi L., Chiesa G., Giovannoni R., Badimon J.J. HDL therapy today: from atherosclerosis, to stent compatibility to heart failure. *Ann. Med.* 2019; 51(7-8): 345-59. DOI: 10.1080/07853890.2019.1694695. Review.
9. Karalis I., Jukema J.W. HDL mimetics infusion and regression of atherosclerosis: is it still considered a valid therapeutic option? *Curr. Cardiol. Rep.* 2018; 20(8): 66. DOI: 10.1007/s11886-018-1004-9.
10. Perova N.V. Atheromarkers of high-density lipoproteins. Part II. High-density lipoproteins: structure, composition, physicochemical and physiological, antiatherogenic properties, their mechanisms and markers (review of literature). *Profilakticheskaya Meditsina.* 2017; 20(4): 37-44. DOI: 10.17116/profmed201720347-54. (in Russian)
11. Torkhovskaya T.I., Kudinov V.A., Zakharova T.S., Markin S.S. Dysfunctional high-density lipoproteins: role in atherogenesis and potential targets for phospholipid therapy. *Kardiologiya.* 2018; 58(3):73-83. DOI: 10.18087/cardio.2018.3.10101. (in Russian)
12. Ossoli A., Simonelli S., Varrenti M., Morici N., Oliva F., Stucchi M. et al. Recombinant LCAT (Lecithin:Cholesterol Acyltransferase) rescues defective HDL (High-Density Lipoprotein)-mediated endothelial protection in acute coronary syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019; 39(5): 915-24. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.311987.
13. Rosenson R.S., Brewer H.B., Ansell B.J., Barter P., Chapman M.J., Heinecke J.W. et al. Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 2016; 13(1): 48-60. DOI: 10.1038/nrcardio.2015.124.
14. Hwang Y.-C., Ahn H.-Y., Park S.-W., Park C.-Y. Association of HDL-C and apolipoprotein A-I with the risk of type 2 diabetes in subjects with impaired fasting glucose. *Eur. J. Endocrin.* 2014; 171: 137-42. DOI: 10.1530/EJE-14-0195.
15. Madsen C.M., Varbo A., Nordestgaard B.G. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *Eur. Heart J.* 2017; 38(32): 2478-86. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx163.
16. Gille A., D'Andrea D., Tortorici M.A., Hartel G., Wright S.D. CSL112 (apolipoprotein A-I [human]) enhances cholesterol efflux similarly in healthy individuals and stable atherosclerotic disease patients highlights. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018; 38(4): 953-63. DOI: 10.1161/atvbaha.118.310538.
17. Allard-Ratick M.P., Kindya B.R., Khambhati J., Engels M.C., Sandesara P.B., Rosenson R.S. et al. HDL: fact, fiction, or function? HDL cholesterol and cardiovascular risk. *Eur. J. Prev. Cardiol.* 2019; 123(10): 1736-7. DOI: 10.1177/2047487319848214.
18. Marques L.R., Diniz T.A., Antunes B.M., Rossi F.E., Caperuto E.C., Lira F.S. et al. Reverse cholesterol transport: molecular mechanisms and the non-medical approach to enhance HDL cholesterol. *Front Physiol.* 2018; 9: 526. DOI: 10.3389/fphys.2018.00526.
19. Kosmas C.E., Martinez I., Sourlas A., Kyriaki V., Bouza K.V., Campos F.N. et al. High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs in Context.* 2018; 7: 212525. DOI: 10.7573/dic.212525.
20. Metel'skaya V.A. Functional diversity of high-density lipoproteins: finding the golden mean. *Atheroscler.* 2021; 17(2): 61-71. DOI: 10.52727/2078-256X-2021-17-2-61-71. (in Russian)
21. Poteryaeva O.N., Usynin I.F. Therapeutic approaches to restoring the antiatherogenic function of high density lipoproteins. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal.* 2021. 75(3): 98-103. DOI: 10.25789/YMJ.2021.75.25. (in Russian)
22. Ferri N., Corsini A., Sirtori C.R., Ruscica M. Present therapeutic role of cholesteryl ester transfer protein inhibitors. *Pharmacol. Res.* 2018; 128: 29-41. DOI: 10.1016/j.phrs.2017.12.028.
23. Tall A.R., Rader D.J. Trials and tribulations of CETP inhibitors. *Circ. Res.* 2018; 122(1): 106-12. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311978.
24. Barter P., Genest J. HDL cholesterol and ASCVD risk stratification: A debate. *Atherosclerosis.* 2019; 283:7-12. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.01.001.
25. Barter P.J., Caulfield M., Eriksson M., Grundy S.M., Kastelein J.J.P., Komajda M. et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357(21): 2109-22. DOI: 10.1056/NEJMoa0706628.
26. Bagdade J., Barter P., Quiroga C., Alaupovic P. Effects of torcetrapib and statin treatment on apoC-III and apoprotein-defined lipoprotein subclasses (from the ILLUMINATE Trial). *Am. J. Cardiol.* 2017; 119(11): 1753-6. DOI: 10.1016/j.amjcard.2017.02.049.
27. Schwartz G.G., Olsson A.G., Abt M., Ballantyne C.M., Barter P.J., Brumm J. et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367(22): 2089-99. DOI: 10.1056/NEJMoa1206797.
28. Tardif J.-C., Rhoads D., Rheume E., Dube M.-P. CETP: Pharmacogenomics-Based Response to the CETP Inhibitor Dalcetrapib. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017; 37(3): 396-400. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.307122.
29. Nicholls S.J., Ruotolo G., Brewer H.B., Kane J.P., Wang M.D., Krueger K.A. et al. Cholesterol efflux capacity and pre-beta-1 HDL concentrations are increased in dyslipidemic patients treated with evacetrapib. *JACC.* 2015; 66: 2201-10. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.09.013.
30. Lincoff A.M., Nicholls S.J., Riesmeyer J.S., Barter P.J., Brewer H.B., Fox K.A.A. et al. Evacetrapib and cardiovascular outcomes in high-risk vascular disease. *N. Engl. J. Med.* 2017; 376(20): 1933-42. DOI: 10.1056/NEJMoa1609581.
31. Bloomfield D., Carlson G.L., Sapre A., Tribble D., McKenney J.M., Littlejohn T.W. et al. Efficacy and safety of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor anacetrapib as monotherapy and coadministered with atorvastatin in dyslipidemic patients. *Am. Heart J.* 2009; 157(2): 352-60. DOI: 10.1016/j.ahj.2008.09.022.
32. Gotto A.M., Kher Jr., U., Chatterjee M.S., Liu Y., Li X.S., Vaidya S. et al. Lipids, safety parameters, and drug concentrations after an additional 2 years of treatment with anacetrapib in the DEFINE study. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2014; 19(6): 543-9. DOI: 10.1177/1074248414529621.
33. HPS3/TIMI55-REVEAL Collaborative Group, Bowman L., Hopewell J.C., Chen F., Wallendszus K., Stevens W., Collins R. et al. Effects of anacetrapib in patients with atherosclerotic vascular disease. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377(13): 1217-27. DOI: 10.1056/NEJMoa1706444.
34. Di Bartolo B.A., Nicholls S.J. Anacetrapib as a potential cardioprotective strategy. *Drug. Des. Devel. Ther.* 2017; 11:3497-502. DOI: 10.2147/DDDT.S114104.
35. Barter P.J., Cochran B.J., Rye K.A. CETP inhibition, statins and diabetes. *Atherosclerosis.* 2018; 278: 143-6. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.09.033.
36. Masson W., Lobo M., Siniawski D., Huerin M., Molinero G., Valero R. et al. Therapy with cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors and diabetes risk. *Diabetes Metab.* 2018; 44(6): 508-13. DOI: 10.1016/j.diabet.2018.02.005.
37. Parolini C., Adorni M.P., Busnelli M., Manzini S., Cipollari E., Favari E. et al. Can infusions of large synthetic HDL containing trimeric apoA-I stabilize atherosclerotic plaques in hypercholester-

BIOCHEMISTRY

- olemic rabbits. *J. Cardiol.* 2019; 35(10): 1400-8. DOI: 10.1016/j.cjca.2019.05.033.
38. Chen W., Wu Y., Lu Q., Wang S., Xing D. Endogenous ApoA-I expression in macrophages: a potential target for protection against atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta.* 2020; 505: 55-9. DOI: 10.1016/j.cca.2020.02.025.
 39. Shaw J.A., Bobik A., Murphy A., Kanellakis P., Blombery P., Mukhamedova N. et al. Infusion of reconstituted high-density lipoprotein leads to acute changes in human atherosclerotic plaque. *Circ. Res.* 2008; 103(10): 1084-91. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.182063.
 40. Tardif J.C., Gregoire J., L'Allier P.L., Ibrahim R., Lesperance J., Heironen T.M. et al. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2007; 297(15): 1675-82. DOI: 10.1001/jama.297.15.jpc70004.
 41. Cuadrado-Godia E., Regueiro A., Nunez J., Diaz-Ricard M., Novella S., Oliveras A. et al. Endothelial progenitor cells predict cardiovascular events after atherothrombotic stroke and acute myocardial infarction. A PROCELL Substudy. *PLOS ONE.* 2015; 10(9): e0132415. DOI: 10.1371/journal.pone.0132415.
 42. Gebhard C., Rheume E., Berry C., Brand G., Kernaleguen A.E., Theberge-Julien G. et al. Beneficial effects of reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) on circulating CD34⁺ cells in patients after an acute coronary syndrome. *PLOS ONE.* 2017. 12(1): e0168448. DOI: 10.1371/journal.pone.0168448.
 43. Gibson M.C., Korjian S., Tricoci P., Daaboul Y., Yee M., Jain P. et al. Safety and tolerability of CSL112, a reconstituted, infusible, plasma-derived apolipoprotein A-I, after acute myocardial infarction: The AEGIS-I Trial (ApoA-I Event Reducing in Ischemic Syndromes I). *Circulation.* 2016; 134(24): 1918-30. DOI: 10.1016/S0735-1097(18)30706-X.
 44. Gille A., D'Andrea D., Tortorici M.A., Hartel G., Wright S.D. CSL112 (apolipoprotein A-I [human]) enhances cholesterol efflux similarly in healthy individuals and stable atherosclerotic disease patients highlights. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018; 38(4): 953-63. DOI:10.1161/atvbaha.118.310538.
 45. Andrews J., Janssan A., Nguyen T., Pisaniello A.D., Scherer D.J., Kastelein J.J. et al. Effect of serial infusions of reconstituted high-density lipoprotein (CER-001) on coronary atherosclerosis: rationale and design of the CARAT study. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 2017; 7(1): 45-51. DOI: 10.21037/cdt.2017.01.01.
 46. Tardy C., Goffinet M., Boubekeur N., Cholez G., Ackermann R., Sy G. et al. HDL and CER001 Inverse-Dose Dependent Inhibition of Atherosclerotic Plaque Formation in apoE^{-/-} Mice: Evidence of ABCA1 Down-Regulation. *PLOS ONE.* 2015; 10: e0137584. DOI: 10.1371/journal.pone.0137584.
 47. Kootte R.S., Smits L.P., van der Valk F.M., Dasseux J.-L., Keyserling C., Barbaras R. et al. Effect of open-label infusion of an apoA-I-containing particle (CER-001) on RCT and artery wall thickness in patients with FHA. *J. Lipid. Res.* 2015; 56(3): 703-12. DOI: 10.1194/jlr.M055665.
 48. Hovingh G.K., Smits L.P., Stefanutti C., Soran H., Kwok S., De Graaf J. et al. The effect of an apolipoprotein A-I-containing high-density lipoproteinmimetic particle (CER-001) on carotid artery wall thickness in patients with homozygous familial hypercholesterolemia: The Modifying Orphan Disease Evaluation (MODE) study. *Am. Heart J.* 2015; 169(5): 736-42.e1. DOI: 10.1016/j.ahj.2015.01.008.
 49. Tardif J.-C., Ballantyne C.M., Barter P., Dasseux J.-L., Fayad Z.A., Guertin M.-C. et al. Effects of the high density lipoprotein mimetic agent CER-001 on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized trial. *Eur. Heart. J.* 2014; 35(46): 3277-86. DOI: 10.1093/eurheartj/ehu171.
 50. Nicholls S.J., Andrews J., Kastelein J.J.P., Merkely B., Nissen S.E., Ray K.K. et al. Effect of serial infusions of CER-001, a pre- β high-density lipoprotein mimetic, on coronary atherosclerosis in patients following acute coronary syndromes in the CER-001 atherosclerosis regression acute coronary syndrome trial: a randomized clinical trial. *JAMA Cardiol.* 2018; 3(9): 815-22. DOI: 10.1001/jamacardio.2018.2121.
 51. Kataoka Y., Andrews J., Duong M., Nguyen T., Schwarz N., Fendler J. et al. Regression of coronary atherosclerosis with infusions of the high-density lipoprotein mimetic CER-001 in patients with more extensive plaque burden. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 2017; 7(3): 252-63. DOI: 10.21037/cdt.2017.02.01.
 52. Rye K.-A., Barter P.J. Cardioprotective functions of HDLs. *J. Lipid Res.* 2013; 55(2): 168-79. DOI: 10.1194/jlr.R039297.
 53. Takata K., Di Bartolo B.A., Nicholls S.J. High-density lipoprotein infusions. *Cardiol Clin.* 2018; 36(2): 311-5. DOI:10.1016/j.ccl.2017.12.012.
 54. Nissen S.E., Tsunoda T., Tuzcu E.M., Schoenhagen P., Cooper C.J., Yasin M. et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003; 290(17): 2292-2300. DOI: 10.1001/jama.290.17.2292.
 55. Wang L., Tian F., Arias A., Yang M., Sharifi B.G., Shah P.K. Comparative effects of diet-induced lipid lowering versus lipid lowering along with apoA-I Milano gene therapy on regression of atherosclerosis. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2016; 21(3): 320-8. DOI: 10.1177/1074248415610216.
 56. Wacker B.K., Dronadula N., Bi L., Stamatikos A., Dichek D.A. Apo A-I (Apolipoprotein A-I) vascular gene therapy provides durable protection against atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018; 38(1): 206-17. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.309565.
 57. Stamatikos A., Dronadula N., Ng P., Palmer D., Knight E., Wacker B.K. et al. ABCA1 overexpression in endothelial cells in vitro enhances apoAI-mediated cholesterol efflux and decreases inflammation. *Hum. Gene Ther.* 2019; 30(2): 236-348. DOI: 10.1089/hum.2018.120.
 58. Dunbar R.L., Movva R., Bloedon L.T., Duffy D., Norris R.B., Navab M. et al. Oral apolipoprotein A-I mimetic D-4F lowers HDL-inflammatory index in high-risk patients: a first-in-human multiple-dose, randomized controlled trial. *Clin. Transl. Sci.* 2017; 10: 455-69. DOI: 10.1111/cts.12487.
 59. Xu W., Qian M., Huang C., Cui P., Li W., Du Q. et al. Comparison of mechanisms of endothelial cell protections between high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I mimetic peptide. *Front. Pharmacol.* 2019; 10: 817. DOI: 10.3389/fphar.2019.00817.
 60. Liu D., Ding Z., Wu M., Xu W., Qian M., Du Q. et al. The apolipoprotein A-I mimetic peptide, D-4F, alleviates ox-LDL-induced oxidative stress and promotes endothelial repair through the eNOS/HO-1 pathway. *JMCC.* 2017; 105: 77-88. DOI:10.1016/j.yjmcc.2017.01.017.
 61. Moreira R.S., Irigoyen M.C., Capcha J.M.C., Sanches T.R., Gutierrez P.S., Garnica M.R. et al. Synthetic apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F protects hearts and kidneys after myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2020; 318(3): R529-R544. DOI: 10.1152/ajpregu.00185.2019.
 62. You J., Wang J., Xie L., Zhu C., Xiong, J. D-4F, an apolipoprotein A-I mimetic, inhibits TGF- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition in human alveolar epithelial cell. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2016; 68(9): 533-41. DOI: 10.1016/j.etp.2016.07.005.
 63. Peng M., Zhang Q., Liu Y., Guo X., Ju J., Xu L. et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptide L-4F suppresses granulocytic-myeloid-derived suppressor cells in mouse pancreatic cancer. *Front. Pharmacol.* 2020; 11: 576. DOI: 10.3389/fphar.2020.00576.
 64. Delk S.C., Chattopadhyay A., Escola-Gil J.C., Fogelman A.M., Reddy S.T. Apolipoprotein mimetics in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2021; 73: 158-68. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.11.002.
 65. Nikolic D., Rizzo M., Mikhailidis D.P., Wong N.C., Banach M. An evaluation of RVX-208 for the treatment of atherosclerosis. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2015; 24(10): 1389-98. DOI: 10.1517/13543784.2015.1083010.
 66. Bailey D., Jahagirdar R., Gordon A., Hafiane A., Campbell S., Chatur S. et al. RVX-208: a small molecule that increases apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein cholesterol in vitro and in vivo. *JACC.* 2010; 55: 2580-9. DOI: 10.1016/j.jacc.2010.02.035.
 67. Nicholls S.J., Puri R., Wolski K., Ballantyne C.M., Barter P.J., Brewer H.B. et al. Effect of the BET protein inhibitor, RVX-208, on progression of coronary atherosclerosis: results of the phase 2b, randomized, double-blind, multicenter, ASSURE trial. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 2016; 16(1): 55-65. DOI: 10.1007/s40256-015-0146-z.
 68. Morton J., Bao S., Vanags L.Z., Tsatralis T., Ridiandries A., Siu C.W. et al. Strikingly different atheroprotective effects of apolipoprotein A-I in early- versus late-stage atherosclerosis. *JACC Basic. Transl. Sci.* 2018; 3(2): 187-99. DOI: 10.1016/j.jacbst.2017.11.004.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Луговая А.В.¹, Эмануэль Т.С.³, Калинина Н.М.^{1,2}, Митрейкин В.Ф.¹, Артемова А.В.¹, Макиенко А.А.¹

РОЛЬ АУТОФАГИИ В РЕГУЛЯЦИИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ОСТРОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

² ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова МЧС РФ, 194044, Санкт-Петербург, Россия;

³ ФГБОУ ВО Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, 191186, Санкт-Петербург, Россия

Постиншемическое нейровоспаление является критическим патофизиологическим процессом в рамках всей схемы церебральной ишемии, охватывающей раннее повреждение и период восстановления тканей. Оно характеризуется микроглиальной и астроглиальной активацией с повышенной экспрессией медиаторов воспаления и сопровождается нарушениями врожденного и адаптивного иммунного ответа. При остром ишемическом инсульте (ИИ) нейровоспаление обусловлено ответом резидентных иммунных клеток микроглии и инфильтрирующих мозговую ткань периферических иммунокомпетентных клеток, которые проникают через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в очаг поражения. Новейшие исследования показали, что воспаление, опосредованное NLRP3-инфламмасомой, имеющее фундаментальное значение в воспалительном ответе врожденного иммунитета, задействовано в гибели нейронов и глиальных клеток при остром ИИ. В обзоре представлены основные механизмы активации NLRP3-опосредованного воспаления при остром ИИ, приводящие к образованию активной формы каспазы-1 и высвобождению провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18, участвующих в инициации и прогрессировании воспалительных реакций в паренхиме головного мозга. Обобщены данные литературы о роли аутофагии в ингибировании острого постиншемического нейровоспаления. Установлено, что аутофагия играет важную роль в регуляции врожденного и адаптивного иммунитета, участвует в поддержании иммунологической аутоотолерантности, контролирует воспалительные реакции. Показано, что аутофагия может подавлять активацию нейровоспаления через широкий спектр белков семейства Atg (autophagy-related proteins), регулирующих аутофагию. Рассмотрена роль аутофагии, как негативного регулятора NLRP3-опосредованного воспаления при остром ИИ. Приведены данные об участии аутофагических белков Beclin-1, LC3 и p62 в подавлении NLRP3-воспаления за счет индукции базовой митофагии. Отмечены перспективы модулирования аутофагии, направленного на подавление постиншемического нейровоспаления, в том числе за счет ингибирования активации NLRP3-инфламмсомы. При подготовке обзора использовались источники литературы, полученные из международных и отечественных баз данных: Scopus, Web of Science, Springer, РИНЦ.

Ключевые слова: аутофагия; Beclin-1; LC3; p62; острый ишемический инсульт; постиншемическое нейровоспаление; медиаторы нейровоспаления; микроглия; аутоиммунное воспаление; NLRP3-инфламмосома; IL-1 β ; IL-18; митофагия; обзор литературы.

Для цитирования: Луговая А.В., Эмануэль Т.С., Калинина Н.М., Митрейкин В.Ф., Артемова А.В., Макиенко А.А. Роль аутофагии в регуляции нейровоспаления при остром ишемическом инсульте (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (7): 391-398. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-391-398>

Для корреспонденции: Луговая Анна Владимировна, канд. мед. наук, врач аллерголог-иммунолог, врач клин. лаб. диагностики отд-ния лаб. диагностики клиники, ассистент каф. клин. лаб. диагностики с курсом мол. медицины; e-mail: g89213159748@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.01.2022

Принята к печати 12.02.2022

Опубликовано 18.07.2022

Lugovaya A.V.¹, Emanuel T.S.³, Kalinina N.M.^{1,2}, Mitreikin V. Ph.¹, Artemova A.V.¹, Makienko A.A.¹

THE ROLE OF AUTOPHAGY IN THE REGULATION OF NEUROINFLAMMATION IN ACUTE ISCHEMIC STROKE (REVIEW OF LITERATURE)

¹ Academician I.P. Pavlov First St Petersburg State Medical University of the Ministry Healthcare of the Russian Federation, 197022, Saint Petersburg, Russian Federation;

² Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, 194044, Saint Petersburg, Russian Federation;

³ The Herzen State Pedagogical University of Russia, 191186, Saint Petersburg, Russian Federation

Postischemic neuroinflammation is a critical pathophysiological process within the entire scheme of cerebral ischemia, covering early damage and the period of tissue repair. It is characterized by microglial and astroglial activation with increased expression of inflammatory mediators and is accompanied by impaired innate and adaptive immune responses. In acute ischemic stroke (IS), neuroinflammation is caused by the response of resident immune cells of microglia and peripheral immunocompetent

cells infiltrating the brain tissue, which penetrate the blood-brain barrier (BBB) into the lesion. Recent studies have shown the important role of the NLRP3-mediated inflammation in the death of neurons and glial cells in acute IS. The review presents the main mechanisms of activation of NLRP3-mediated inflammation in acute IS, leading to the caspase-1 formation and the IL-1 β and IL-18 release, which are involved in the initiation and progression of inflammation in the brain parenchyma. The literature data on the role of autophagy in the inhibition of postischemic neuroinflammation are summarized. Autophagy can suppress neuroinflammation through a wide range of the autophagy – related proteins. The role of autophagy as a negative regulator of NLRP3-mediated inflammation in acute IS is analyzed. Data on the participation of autophagic proteins Beclin-1, LC3, and p62 in the suppression of NLRP3 inflammation due to the induction of basic mitophagy are presented. Prospects for modulating autophagy aimed at suppressing postischemic neuroinflammation, including the inhibition of NLRP3-inflammasome, have been noted. The review was based on sources from international and national data bases: Scopus, Web of Science, Springer, RINC.

Key words: autophagy; Beclin-1; LC3; p62; acute ischemic stroke; postischemic neuroinflammation; neuroinflammation mediators; microglia; autoimmune inflammation; NLRP3-inflammasome; IL-1 β ; IL-18; mitophagy; review.

For citation: Lugovaya A.V., Emanuel T.S., Kalinina N.M., Mitreikin V. Ph., Artemova A.V., Makienko A.A. The role of autophagy in the regulation of neuroinflammation in acute ischemic stroke (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (7): 391-398 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-391-398>

For correspondence: Lugovaya A.V., PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Clinical Laboratory Diagnostition, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Assistant at the Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a course in molecular medicine; e-mail: g89213159748@gmail.com

Information about authors:

Lugovaya A.V., <https://orcid.org/0000-0002-7690-9064>;
Emanuel T.S., <https://orcid.org/0000-0003-3159-8714>;
Kalinina N.M., <https://orcid.org/0000-0003-1752-6888>;
Mitreikin V. Ph., <https://orcid.org/0000-0001-5977-8907>;
Artemova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-1793-3240>;
Makienko A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3720-7772>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 12.01.2022

Accepted 12.02.2022

Published 18.07.2022

Введение. Острый ишемический инсульт (ИИ) является актуальной медицинской и социальной проблемой в связи с широкой распространенностью цереброваскулярной патологии, высоким уровнем летальности, частым развитием инвалидности и социальной дезадаптации перенесших его больных [1, 2]. Инвалидизация вследствие инсульта связана с двигательными и когнитивными нарушениями [3], приводящими к длительной или пожизненной утрате трудоспособности среди взрослого населения [4].

Постинсультный воспалительный ответ играет существенную роль в патогенезе острого ИИ. С одной стороны он направлен на удаление некротизированной ткани из зоны ишемии, с другой стороны он приводит к увеличению объема очага поражения и отягощает заболевание. Первоначальное повреждение нейронов возникает в течение нескольких минут после ишемической атаки, тогда как воспалительная реакция, способствующая прогрессированию патологии, может продолжаться от нескольких дней до нескольких месяцев [5, 6].

В ответ на острую ишемию развиваются местные (в пораженном органе) и системные воспалительные реакции, а также иммунный ответ [1]. Местные воспалительные и аутоиммунные реакции играют значимую роль в каскаде микроциркуляторных нарушений, которые возникают в условиях ранней реперфузии [4]. Привлеченные хемокинами лейкоциты при экстравазации выделяют матриксные металлопротеиназы, которые расщепляют плотные контакты между эндотелиальными клетками сосудов головного мозга [5, 7]. Это приводит к повреждению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), вследствие чего повышается проницаемость сосудов и развивается вазогенный отек – одно из самых грозных осложнений инфаркта головного мозга [8, 9].

Стойкий аутоиммунный ответ на антигены мозга имеет негативные долгосрочные последствия, в том числе когнитивные нарушения, такие как постинсультная деменция. Следует подчеркнуть, что иммунная активация способствует вторичному повреждению тканей головного мозга при остром ИИ [10].

Постинсультное воспаление блокирует нейрогенез в так называемых нейрогенных областях (субвентрикулярной и субгранулярной зонах мозга), который стимулируется в ответ на ишемическое повреждение, и, соответственно, препятствует процессу регенерации и естественному восстановлению нейронов [11, 12].

Установлено, что универсальным медиатором постинсультного воспаления служит интерлейкин-1 (IL-1) [7]. При остром ИИ этот провоспалительный цитокин активирует практически все воспалительные процессы: поляризует иммунные клетки по провоспалительному фенотипу, вызывает рекрутинг лейкоцитов из кровотока, стимулирует чрезмерную активацию NLRP3-инфламмосомы, приводящую к гибели нейронов и микроглии по механизму пироптоза [5]. Экспериментальные исследования на животных показали, что применение рекомбинантного человеческого IL-1RA (антагониста рецептора IL-1) уменьшает область повреждения мозга при ишемическом инсульте и сопутствующие ему симптомы, а также способствует восстановлению утраченных двигательных функций [7, 10]. В настоящее время блокирование IL-1 и NLRP3-рецепторов рассматривают как перспективный подход к ограничению воспаления при ишемическом инсульте [13]. В доклинических исследованиях размер области некроза уменьшали препараты, прямо или косвенно блокирующие образование инфламмосом: синоменин, глибурид, MCC950 [14, 15].

В последнее время большой интерес вызывает перспектива модулирования аутофагии при остром ИИ, являющейся мощным регулятором воспалительных реакций [16, 17]. Экспериментальные исследования показали, что аутофагия подавляет активацию NLRP3-воспаления за счет ингибирования образования активного IL-1 из неактивной формы его предшественника про-IL-1 [18, 19]. Во многих противовоспалительных механизмах, реализуемых аутофагией при остром ИИ, участвуют ключевые белки аутофагического процесса Beclin-1, LC3 и p62 [7, 20, 21].

Показано, что при остром ИИ аутофагия задействована в важнейших этапах воспалительного каскада, выступая либо в качестве индуктора, либо в роли ингибитора постишемического нейровоспаления [21,22]. По мнению ученых, изучение роли аутофагии в воспалительных реакциях при остром ИИ, детальное понимание сигнальных путей, посредством которых аутофагия воздействует на ключевые медиаторы воспаления, открывает возможности регулирования постишемического нейровоспаления с помощью процесса аутофагии и перспективы создания новых терапевтических препаратов для лечения острого ИИ [16, 17, 21].

Механизмы развития аутоиммунного воспаления при остром ИИ. Острый ИИ сопровождается асептическим воспалением, индуцирующим активацию костимулирующих молекул в процессе ответной реакции врожденного иммунитета на повреждение ткани головного мозга. Постоянно прогрессирующая деструкция нейрональных антигенов способствует увеличению объема очага ишемического поражения [7]. Исследования последних 10 лет существенно расширили представления о механизмах нарушения врожденного и адаптивного иммунного ответа, способствующих развитию аутоиммунных реакций после острого ИИ [22]. Постишемическое аутоиммунное воспаление обусловлено ответом иммунокомпетентных клеток микроглии и инфилтрирующих мозговую ткань периферических иммунных клеток, которые проникают через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) в очаг поражения после ишемической атаки [23].

Неотъемлемой частью патофизиологии постишемического нейровоспаления являются Т-клетки. Начальный воспалительный каскад приводит к миграции Т-лимфоцитов, реализующих как деструктивное воздействие на ткань головного мозга, опосредованное CD4⁺, CD8⁺ и γ Т-клетками, так и защитные эффекты, осуществляемые регуляторными Т-лимфоцитами (T-reg) [24]. В результате острой церебральной ишемии происходит активация и диверсификация локального Т-клеточного ответа, что усугубляет ишемическое повреждение головного мозга. Показано, что с прогрессированием ишемии спектр нейрональных аутоантигенов расширяется, в связи с чем аутоагрессивные клоны CD4⁺-Т-лимфоцитов приобретают новую реактивность к клеткам головного мозга [7, 24]. Установлено, что аутореактивные Т-клетки (в том числе миелин-реактивные Т-лимфоциты) оказывают негативное влияние на исход инсульта [16, 25].

Ключевую роль в аутоиммунном воспалении при остром ИИ отводят Т-хелперам 1 типа (Th1), продуцирующим в зоне поражения провоспалительные цитокины TNF- α (ФНО- α), IFN- γ (интерферон- γ), IL-2 (интерлейкин-2) и IL-12 (интерлейкин-12). Не менее важное значение имеют Th17-хелперы (Т-хелперы 17 типа), секре-

тирующие IL-17A (интерлейкин-17A), который является мощным индуктором тканевого воспаления [26]. В экспериментальных моделях острого ИИ с использованием лабораторных животных показано, что лимфоцитарный инфильтрат мозговой ткани в пенумбре представлен Т-хелперами 1 типа, цитотоксическими Т-лимфоцитами (CD8⁺ЦТЛ) и Т-NK-клетками (естественные киллерные Т-клетки) [27].

Помимо участия в нейровоспалении Т-лимфоциты также играют роль в индуцированной инсультом иммуносупрессии. Показано, что у больных с тяжелой формой острого ИИ, характеризующейся обширным поражением головного мозга и выраженной лейкоцитарной инфильтрацией мозговой ткани, отмечается лейкопения и снижение цитотоксической активности CD8⁺ЦТЛ, Т-NK- и NK-клеток (естественные киллерные клетки периферической крови [7,8,10].

Цитокины играют центральную роль в Т-клеточных иммунных ответах при остром ИИ. Ключевые роли в Т-клеточно-опосредованном аутоиммунном воспалении установлены для TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , а также IL-6, IL-10, IL-17 и IL-21 (интерлейкинов -1 β , -6, -10, -17 и -21) [28]. В остром периоде ИИ наблюдается дисбаланс цитокинового статуса с дефицитом противовоспалительных цитокинов и повышением триады провоспалительных цитокинов: TNF α , IL-1 β и IL-6. Последний является предиктором геморрагической трансформации острого ИИ при концентрации в крови более 40 пг/мл [4,16]. Повышение в сыворотке и спинномозговой жидкости (СМЖ) противовоспалительного цитокина IL-10 (интерлейкина 10), обладающего нейропротективным эффектом, напротив, свидетельствует о включении защитных компенсаторных механизмов и, как правило, сочетается с благоприятным исходом заболевания [3].

При формировании фокальной ишемии головного мозга в крови и СМЖ больных выявляются органоспецифические (к основному белку миелина, к коллагену базальной мембраны эндотелиальных клеток сосудов головного мозга) и неорганоспецифические (антинуклеарные) аутоантитела [8]. В периферической крови больных острым ИИ значительно повышена концентрация белков теплового шока-70 (HSP-70 – Heat shock proteins), являющихся эндогенными лигандами для Toll-подобных рецепторов 4 (TLR4 – Toll-like receptors) – ключевых рецепторов врожденного иммунитета [22]. Повышенный уровень поверхностной экспрессии TLR4 на моноцитах периферической крови больных с атеротромботическим вариантом острого ИИ положительно коррелирует со степенью тяжести состояния пациентов по шкале инсульта Национального института здоровья (NIHSS – National Institutes of Health Stroke Scale) [1]. Установлено, что главным эффекторным цитокином, активирующим поверхностную экспрессию TLR4 на клетках периферической крови, является TNF- α [7, 8].

Выявлено участие ММП-2 и ММП-9 (матриксных металлопротеиназ-2 и -9) в нарушении целостности ГЭБ и в сигнальных каскадах, приводящих к нейрональной гибели [8, 29]. Установлено, что ММП-2 и ММП-9 способствуют гидролитическому отщеплению поверхностных форм клеточных рецепторов и лигандов с образованием физиологически активных растворимых форм, в том числе индукторов апоптоза: растворимого Fas-лиганда (sFasL – soluble Fas ligand) и TNF-лиганда (sTNFL – soluble TNF ligand) [1, 7]. Показано, что повышение концентрации сывороточной ММП-9 при ате-

ротромботическом варианте острого ИИ коррелирует со степенью тяжести заболевания по шкале NIHSS [1].

Современные представления о NLRP3-опосредованном воспалении. Механизмы развития. Роль в патогенезе острого ИИ. Продолжают накапливаться доказательства, свидетельствующие о важной роли NLRP3-опосредованного воспаления в патогенезе ишемического инсульта [19, 30, 31].

NLRP-воспалительные реакции реализуются инфламмасомами (inflammasomes) – мультипротеиновыми олигомерными комплексами. Инфламмасома является молекулярной платформой, которая обеспечивает активацию каспазы-1, созревание и секрецию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18, способствует гибели инфицированных макрофагов по механизму пироптоза, обеспечивая защиту организма от инфекционных агентов, и, таким образом, играет важную роль в реакциях врожденного иммунитета [18].

NLRP3-инфламмасома (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor [NLR] family pyrin domain-containing 3) является членом семейства NOD-подобных рецепторов клеток врожденного иммунитета и относится к белкам подсемейства NLRP, которое насчитывает 14 белков (NLRP1-14) [19]. NOD-подобные рецепторы (NLR – NOD-Like-Receptors) представляют собой семейство рецепторов PRR (Pattern Recognizing Receptors – паттернраспознающих рецепторов), позволяющих клеткам врожденного иммунитета обнаруживать микробные клетки. В зависимости от локализации выделяют мембранные, растворимые и цитоплазматические формы рецепторов семейства PRR [32].

NOD-подобные рецепторы выполняют функцию цитозольных сенсоров, которые реагируют на «сигналы опасности», представляющие собой следующие молекулярные паттерны: PAMP (pathogen-associated molecular patterns), DAMP (damage-associated molecular patterns), TAMP (tumor associated molecular patterns) и SAMP (self associated molecular patterns) [16, 30]. DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями, имеют важное патогенетическое значение при остром ИИ, поскольку образуются при деструкции ткани головного мозга [18]. «Сигналы опасности» по одиночке или в комбинации стимулируют активацию инфламмосомы [19].

Известны 3 канонических механизма активации NLRP3-инфламмосомы: повышенное содержание АФК (активных форм кислорода) в клетке, уменьшение внутриклеточной концентрации калия и разрыв лизосомы [19,38]. К дополнительным индукторам NLRP3-воспаления относится окислительный стресс и митохондриальная дисфункция [30].

Первый механизм активации NLRP3-воспаления реализуется за счет того, что повышенное содержание АФК активирует белок TXNIP (thioredoxin-interacting protein), который является АФК-чувствительным регулятором активации NLRP3-инфламмосомы. Связывание белка TXNIP с доменом инфламмосомы LRR (leucine-rich repeat domain – обогащенный повторами лейцина домен) приводит к образованию активного воспалительного NLRP3-комплекса [19].

Вторым механизмом активации NLRP3-инфламмосомы является отток K⁺ из клетки, происходящий в результате воздействия высоких концентраций внеклеточного АТФ или бактериальных токсинов на пуриnergический рецептор P2X7 (P2X7), который является

важным сигнальным путем для активации NLRP3-опосредованного воспаления [32].

Третьим механизмом активации NLRP3-инфламмосомы является разрыв лизосомальной мембраны, приводящий к непосредственной активации комплекса TAK1/JNK (Transforming Growth Factor β (TGF- β) activated Kinase 1/c-Jun N-terminal Kinase), который является главной составляющей сигнального каскада протеинкиназы MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) [30]. MAPK является мощным активатором инфламмосомы [18, 19].

Для запуска всех механизмов активации NLRP3-воспаления необходимы 2 сигнала: праймирующий и активирующий [81]. Первоначальный праймирующий сигнал индуцирует активацию NF- κ B (Nuclear Factor of κ -chain B-lymphocytes – ядерный фактор κ -цепи В-лимфоцитов) и приводит к транскрипции генов про-IL-1 β и про-IL-18 (предшественники IL-1 β и IL-18) [20,33]. Второй активирующий сигнал под воздействием PAMP, DAMP и прочих стимулов запускает «сборку» воспалительного комплекса NLRP3 [33, 34].

Следует подчеркнуть, что сигнальные пути NF- κ B и MAPK исключительно важны для активации и повышенной экспрессии NLRP3-инфламмосом в чувствительных корковых центрах головного мозга в условиях ишемии. Показано, что активация NF- κ B- и/или MAPK-опосредованных сигнальных каскадов четко ассоциирована с повышением экспрессии воспалительных NLRP3-комплексов в пораженных ишемией нейронах [18, 32].

Согласно данным литературы, NLRP3-опосредованное воспаление играет значительную роль в патогенезе ишемического инсульта, стимулируя посредством активации каспазы-1 высвобождение активных форм цитокинов IL-1 β и IL-18 из их предшественников про-IL-1 β и про-IL-18 [18, 19, 33]. Основным источником IL-1 β при остром ИИ является микроглия [86]. Цитокины IL-1 β и IL-18 участвуют в инициации и усилении воспалительных реакций в паренхиме головного мозга [22]. У пациентов с острым ИИ повышенный уровень IL-1 β выявляется как в крови, так и в СПЖ [34].

В экспериментальных моделях острого ИИ с использованием лабораторных животных было обнаружено динамическое изменение клеточной локализации NLRP3-опосредованного воспаления. Установлено, что на ранней стадии острого периода ИИ главным источником активированных NLRP3-инфламмосом является микроглия. Затем NLRP3-инфламмосомы активируются в нейронах и эндотелиальных клетках микрососудов головного мозга, а к концу острого периода ИИ в основном концентрируются в нейронах [29]. По мнению авторов, это свидетельствует об участии NLRP3-воспаления в отсроченной гибели нейронов при остром ИИ [29, 30].

Недавние исследования показали новую роль селективной митохондриальной аутофагии (митофагии) в регуляции воспалительных процессов при остром ИИ [35, 36]. Повреждение митохондрий приводит к снижению уровня АТФ, нарушению гомеостаза Ca²⁺, уменьшению содержания NAD⁺ (никотинамидадениндинуклеотид) и избытку АФК, которые высвобождаются дисфункциональными митохондриями [36]. Показано, что повреждение НАДФН-оксидазы митохондриальными АФК (мтАФК) приводит к активации инфламмосомы [37]. Дополнительным стимулом являются митохондриальные ДНК (мтДНК), высвобождаемые в цитоплазму из дисфункциональных митохондрий

и выступающие в роли DAMP, на которые реагирует NOD-подобные рецепторы, что приводит к активации NLRP3-опосредованного воспаления [19]. В экспериментальной модели острого ИИ применение высокоэффективного митохондриального протектора диазоксиды, предотвращающего снижение митохондриального потенциала, ингибировало NLRP3-воспаление в нейронах и микроглии у крыс [36, 37].

В разных типах клеток головного мозга была исследована связь между активацией NLRP3-воспаления и митохондриальной дисфункцией, показавшая приоритетное значение последней как триггера постишемического нейровоспаления в микроглии [30]. Поскольку ключевую роль в митохондриальной дисфункции играет недостаточная митофагия, приводящая к накоплению дисфункциональных митохондрий, генерирующих избыточное количество АФК, ингибирование NLRP3-воспаления путем модулирования митофагии может рассматриваться в качестве одной из стратегий новых методов терапии острого ИИ [35, 37].

Роль аутофагии в развитии аутоиммунного воспаления. Поддержание клеточного гомеостаза является лишь одной из многих функций, выполняемых аутофагией. Принимая участие в регуляции врожденного и адаптивного иммунитета, аутофагия контролирует реализацию воспалительных реакций, в том числе иммунных: продукцию интерферонов, синтез и активацию цитокинов, регуляцию эффероцитоза (фагоцитоза мертвых и умирающих клеток), активацию локального и системного воспаления [38, 39].

Предоставлены многочисленные доказательства участия аутофагии в регуляции продукции провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-17, IL-18, IL-23) и хемокинов (CXCL1) [16, 40, 41].

Взаимосвязь между аутофагией и воспалением сложна и многогранна. Взаимодействия между этими процессами работают по принципу обратной связи. Аутофагия участвует в индукции и подавлении воспаления и, в свою очередь, может как индуцироваться, так и подавляться медиаторами воспаления [10, 42]. Установлено, что, TNF- α и интерлейкин IL-6 стимулируют аутофагию также, как и аутофагия способствует секреции этих провоспалительных цитокинов [40].

Аутофагия является важнейшим регулятором установления и поддержания иммунологической аутоиммунной толерантности, в связи с чем она вовлечена в патогенез аутоиммунных заболеваний [16, 40, 43]. При ревматоидном артрите (РА) выявлена ассоциация между интенсивностью аутофагии в мононуклеарах периферической крови и активностью заболевания, установлена прямая корреляционная связь между выраженностью аутофагии и концентрацией провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 в крови пациентов с РА [21]. Положительная корреляция между повышенным уровнем сывороточного TNF- α и содержанием активных аутофагосом в циркулирующих иммунных клетках у пациентов с РА свидетельствует о том, что TNF- α может стимулировать трансформацию растворимой формы белка LC3-I в его липидированную форму LC3-II, являющуюся показателем формирования аутофагосом [44, 45]. Кроме того, после шести месяцев терапии моноклональными антителами к TNF- α было выявлено значительное снижение уровня активных аутофагосом, уменьшение концентрации сывороточного TNF- α и активности РА у обследуемых пациентов [40].

Обнаружена активация аутофагии в наивных В-клетках у пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), а также усиление аутофагии в В-лимфоцитах мышечной ткани с СКВ на ранних и переходных стадиях развития В-клеток [41, 46]. Установлено, что усиленная аутофагия наивных В-клеток на этапе прохождения контрольной точки толерантности после выхода из костного мозга позволяет аутореактивным В-клеткам избежать физиологической делеции. В результате, аутореактивные В-лимфоциты выживают и пролиферируют с образованием плазматических клеток, продуцирующих высокоavidные аутоантитела, что способствует развитию аутоиммунной патологии [41].

Таким образом, базовая аутофагия в нормальных физиологических условиях способствует поддержанию иммунологической толерантности, в то время как чрезмерная активация аутофагии в иммунокомпетентных клетках или наличие дефектов генов, ингибирующих аутофагию, приводят к развитию аутоиммунных процессов [16, 40].

Аутофагия в регуляции постишемического нейровоспаления. Согласно последним экспериментальным данным аутофагия ассоциирована с постишемическим нейровоспалением и участвует в его регуляции [7, 10]. Взаимосвязь этих процессов при остром ИИ недостаточно освещена в литературных источниках, в связи с чем заслуживает более детального рассмотрения.

Недавние исследования показали, что в Т-клетках с дефицитом аутофагии был выявлен повышенный уровень некоторых проапоптотических молекул: прокаспазы-3, каспазы-8, каспазы-9 и индуктора апоптоза протеина Bim, который относится к белкам семейства Bcl-2 [47]. Кроме того, ингибирование аутофагии в Т-лимфоцитах способствовало накоплению дисфункциональных органелл и усилению генерации АФК в цитоплазме, индуцирующих гибель Т-клеток [10, 48]. Принимая во внимание ключевую роль аутореактивных Т-лимфоцитов в деструкции нейрональных антигенов и развитии аутоиммунного воспаления при остром ИИ [27], ингибирование аутофагии в отдельных субпопуляциях Т-клеток (исключая T-reg) представляется перспективным методом подавления их провоспалительной активности.

В последних отчетах аутофагия наряду с оксидом азота, интерферонами 1 типа, эффекторными Т-клетками, Т-клетками памяти, вирусом кори рассматривается как негативный регулятор NLRP3-воспаления [18, 32]. Это подтверждается экспериментальными данными, наглядно демонстрирующими, что применение ингибиторов аутофагии способствует активации NLRP3-воспаления [19, 29]. Показано, что макрофаги с нокаутом Atg7 характеризуются значительно повышенной продукцией IL-1 β в ответ на индукторы воспаления по сравнению с обычными макрофагами [16, 49]. В эксперименте с использованием клеточных культур мононуклеаров периферической крови (МНПК) мышечной ткани установлено, что после обработки макрофагов рапамицином (индуктором аутофагии) про-IL-1 β переносится белками, участвующими в процессе аутофагии, в аутофаголизосомы для деградации. Данный путь способствует опосредованному аутофагией снижению секреции IL-1 β в ответ на воздействие индукторов NLRP3-воспаления [30].

Негативную регуляцию NLRP3-воспаления аутофагия реализует с помощью трех основных механизмов:

1) элиминация эндогенных активаторов воспаления (агонистов NLRP3-воспаления) [18]; 2) осуществление деградации основных компонентов воспалительного комплекса в аутофаголизосомах [19,32]; 3) удаления продуктов воспаления (провоспалительные цитокины IL-1 β и IL-18) [37].

Способность аутофагии ингибировать активацию NLRP3-воспаления находит фармакологическое применение в экспериментальных исследованиях с использованием лабораторных животных. В модели окклюзии средней мозговой артерии успешно применяется противовоспалительный препарат синоменин, обладающий мощным нейропротективным эффектом, который проявляется в значительном снижении астроцитарной и микроглиальной активации, уменьшении симптомов неврологического дефицита у мышей и более частым благополучным исходом инсульта [19]. Ключевым механизмом, за счет которого синоменин реализует подавление NLRP3-воспаления, является активация протеинкиназы AMPK — важнейшего индуктора аутофагии [18, 37].

В экспериментальных моделях острого ИИ с использованием клеточных культур МНПК мышей показано, что аутофагия может негативно регулировать активацию воспаления через широкий спектр белков-регуляторов аутофагического процесса (Atg5, Atg6, Atg7, Atg8 и др.) [18]. Установлено, что нокаут гена белка Atg16L, участвующего в инициации аутофагии, приводит к повышенной активации каспазы-1 и гиперпродукции IL-1 β и IL-18 макрофагами после обработки эндотоксином [50]. Показано, что в макрофагах, обработанных ингибитором аутофагии 3-метиладенином (3-МА), значительно увеличивается выработка IL-1 β в ответ на воздействие индукторов воспаления [49].

Установлено, что недостаточная селективная митохондриальная аутофагия (миитофагия) играет существенную роль в активации NLRP3-опосредованного воспаления в микроглии при остром ИИ [36,51]. Базовая митофагия сдерживает воспалительную активность за счет уменьшения выработки АФК, являющихся не только важнейшими участниками ишемического каскада, но и триггерами NLRP3-воспаления [35]. Подавление активации NLRP3-воспаления митофагия реализует через удаление поврежденных митохондрий, высвобождающих мтАФК и мтДНК [37]. Ингибирование митофагии приводит к накоплению АФК-продуцирующих митохондрий и, как следствие, к усилению активации NLRP3-воспаления [30].

Установлено, что аутофагические белки Beclin-1 и LC3 регулируют опосредованный каспазой-1 врожденный иммунный ответ в рамках выполнения своей важнейшей функции по поддержанию митохондриального гомеостаза [36]. Показано, что Beclin-1 и LC3 необходимы для нормального протекания конститутивной базовой митофагии. Взаимодействие Beclin-1–PARK2 необходимо для транслокации протеина PARK2 (PARKIN RBR E3 ubiquitin protein ligase – E3 убиквитин-лигаза Паркина RBR) в митохондрии и индукции базовой митофагии [17,21]. Известно, что недостаточная PARK2-зависимая митофагия приводит к митохондриальной дисфункции и, соответственно, активации NLRP3-опосредованного воспаления [36, 52].

Особый интерес вызывают недавно опубликованные отчеты, сообщающие что NF- κ B – ключевой активатор NLRP3-воспаления, может сдерживать активацию

NLRP3-инфламмосомы за счет индукции р62-зависимой митофагии, предотвращая, тем самым, чрезмерное тканевое повреждение при остром ИИ [33]. Показано, что путь NF- κ B→р62→митофагия представляет собой макрофагальную внутреннюю регуляторную «петлю безопасности», через которую NF- κ B ограничивает свою собственную активность, стимулирующую воспаление, и, тем самым, предупреждает избыточный воспалительный ответ, который может быть губителен для макроорганизма. Установлено, что только белок-адаптер р62 распознает митохондрии, которые были повреждены агонистами NLRP3 [20,33]. Поврежденные митохондрии высвобождают «сигналы опасности», которые распознаются белком р62, удаляющим дисфункциональные митохондрии посредством р62-опосредованной митофагии [37,53]. Недавно было установлено, что противовоспалительный модуль «NF- κ B→р62» предотвращает чрезмерную активацию каспазы-1 и, как следствие, гиперпродукцию IL-1 β и IL-18, приводящую к гибели макрофагов и неконтролируемому накоплению нейтрофилов [20, 53].

Следовательно, недавно обнаруженный сигнальный путь NF- κ B→р62→митофагия способствует пониманию, казалось бы, противоречивого факта того, что активация NF- κ B, инициирующая транскрипцию генов ключевых медиаторов воспаления, в то же время обеспечивает защиту от чрезмерного воспалительного ответа [20]. В 2016 г. Z. Zhong и соавт. [33] одними из первых описавшие этот сигнальный путь, сформулировали понятие «Selflimiting inflammation» (самоограничивающееся воспаление), играющее важную роль в инициации процессов регенерации, необходимых для восстановления целостности иммунных барьеров, что делает ткани организма менее уязвимыми для PAMP, DAMP и прочих факторов, стимулирующих запуск воспалительного процесса.

Заключение. Таким образом, аутофагия представляет собой многоэтапный, тонко регулируемый процесс, который следует рассматривать как возможную цель для терапевтических вмешательств при остром ИИ. Изменение закономерного протекания аутофагии, ее скорости и исхода с помощью применения индукторов или ингибиторов на разных стадиях аутофагического процесса может существенно влиять на динамику острого периода ИИ, период реабилитации и исход заболевания [21,54].

Принимая во внимание многочисленные механизмы, с помощью которых аутофагия влияет на отдельные этапы постишемического нейровоспаления, целесообразно рассмотреть возможных путей ее модуляции с целью воздействия на определенные мишени воспалительного процесса. В качестве подобных мишеней могут выступать аутореактивные T-лимфоциты, NLRP3-инфламмосома, белки сигнальных комплексов, активирующих NLRP3-воспаление, рецепторы, участвующие в митофагии, белки, регулирующие митохондриальную динамику. По мнению ряда авторов, стратегия одновременного нацеливания и на модулирование аутофагии, и на подавление постишемического нейровоспаления, в том числе за счет регулирования митофагии, может оказаться более эффективной в потенциальной терапии острого ИИ, чем применение только одного из вышеперечисленных методов воздействия на ключевых участников патогенеза острого ИИ [17, 58].

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6-8, 9-54, см. REFERENCES)

1. Константинова Е.В., Кочетов А.Г., Шостак Н.А., Шурдумова М.Х., Еремин И.И., Лянг О.В., Скворцова В.И. Особенности иммунного ответа и воспалительной реакции при атеротромботическом инсульте и инфаркте миокарда. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2015; 115(12): 48-53.
2. Хасанова Д.Р., Данилова В.И., ред. Инсульт. Современные подходы диагностики, лечения, и профилактики: методические рекомендации. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019.
3. Кулеш А.А., Дробаха В.Е., Некрасова И.В., Куклина Е.М., Шестаков В.В. Нейровоспалительные, нейродегенеративные и структурные церебральные маркеры основных клинических вариантов постинсультных когнитивных нарушений в остром периоде ишемического инсульта. *Вестник РАМН*. 2016; 71(4): 304-12.
4. Баранова Е.В. Маркеры воспаления у больных с различными типами мозговых инсультов. *Международный неврологический журнал*. 2014; 5(67): 45-8.
5. Иванов Е. В., Гаврилова С. А., Кошелев В. Б. Механизмы развития острого ишемического повреждения головного мозга: клинические и экспериментальные возможности его коррекции. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2021; 20(2): 5-19. DOI: 10.24884/1682-6655-2021-20-2-5-19.
6. Баринов Э.Ф., Евтушенко С.К., Максименко Т.Л., Баринова М.Э., Твердохлеб Т.А., Евтушенко И.С. Механизмы регуляции воспаления в ишемизированном мозге (научный обзор). *Международный неврологический журнал*. 2013; 8(62): 13-21.

REFERENCES

1. Konstantinova E.V., Kochetov A.G., Shostak N.A., Shurdumova M.Kh., Eremin I.I., Lyang O.V., Skvortsova V.I. Characteristics of immune response and inflammatory reaction in atherothrombotic stroke and myocardial infarction. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova. Spetsvypuski*. 2015; 115(12): 48-53. (in Russian)
2. Khasanova D.R., Danilova V.I., ed. Stroke. Modern approaches to diagnosis, treatment, and prevention: guidelines. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2019. (in Russian)
3. Kulesh A.A., Drobakha V.E., Nekrasova I.V., Kuklina E.M., Shestakov V.V. Neuroinflammatory, Neurodegenerative and Structural Brain Biomarkers of the Main Types of Post-Stroke Cognitive Impairment in Acute Period of Ischemic Stroke. *Vestnik RAMN*. 2016; 71(4): 304-12. (in Russian)
4. Baranova Ye.V. Markers of inflammation in patients with different types of cerebral strokes. *Mezhdunarodnyi nevrologicheskii zhurnal*. 2014; 5(67): 45-8. (in Russian)
5. Ivanov E. V., Gavrilova S. A., Koshelev V. B. Brain acute ischemia mechanisms: implications to experimental and clinical treatment *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya*. 2021; 20(2): 5-19. (in Russian)
6. Tuttolomondo A., Maida C., Pinto A. Inflammation and Inflammatory Cell Recruitment in Acute Cerebrovascular Diseases. *Curr. Immunol Rev*. 2015; 11(1): 24-32.
7. Tsygan N.V., Trashkov A.P., Litvinenko I.V., Yakovleva V.A., Ryabtsev A.V., Andrey G. Vasiliev A.G. and Churilov L.P. Autoimmunity in acute ischemic stroke and the role of blood-brain barrier: the dark side or the light one? *Front. Med*. 2019; 13: 420-6.
8. Barinov E.F., Yevtushenko S.K., Maksimenko T.L., Barinova M.E., Tverdokhlebl T.A., Yevtushenko I.S. Mechanisms of regulation of inflammation in the ischemic brain (scientific review). *Mezhdunarodnyi nevrologicheskii zhurnal*. 2013; 8(62): 13-21. (in Russian)
9. Obermeier B., Daneman R., Ransohoff R.M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*. 2013; 19: 1584-96.
10. Mo Y., Sun Y.Y., Liu K.Y. Autophagy and inflammation in ischemic stroke. *Neural. Regen. Res*. 2020; 15(8): 1388-96. DOI:10.4103/1673-5374.274331.
11. Schiller M., Bekeredjian-Ding I., Heyder P., Blank N., Ho A.D., Lorenz H.M. Autoantigens are translocated into small apoptotic

- bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ*. 2008; 15(1): 183-1.
12. Shi F., Dong Z., Li H., Liu X., Liu H., Dong R. MicroRNA-137 protects neurons against ischemia/reperfusion injury through regulation of the Notch signaling pathway. *Experimental Cell Research*. 2017; 352(1): 1-8. DOI:10.1016/j.yexcr.2017.01.015.
13. Gao L., Dong Q., Song Z., Shen F., Shi J., Li Y. NLRP3 inflammasome: a promising target in ischemic stroke. *Inflammation Research*. 2017; 66: 17-24.
14. Hou Y., Wang Y., He Q., Li L., Xie H., Zhao Y. et al. Nrf2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through regulating Trx1/TXNIP complex in cerebral ischemia reperfusion injury. *Behav. Brain. Res*. 2018; 336: 32-9. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.06.027.
15. Osowski C. M., Hara T. O., Sullivan-Murphy B., Kanekura K., Lu S., Hara M. et al. Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab*. 2012; 16(2): 265-73.
16. Deretic V. Multiple regulatory and effector roles of autophagy in immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2009; 21(1): 53-62.
17. Pierzynowska K., Gaffke L., Zuzanna Cyske Z., Puchalski M., Rintz E., Bartkowski M. et al. Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. *Metabolic Brain Disease*. 2018; 33: 989-1008. DOI:10.1007/s11011-018-0214-6.
18. Sun Q., Fan J., Billiar T.R. and Scott M.J. Inflammasome and Autophagy Regulation: A Two-way Street. *Mol. Med*. 2017; 23: 188-95.
19. Zhou K., Shi L., Wang Y., Chen S. and Zhang J. Recent Advances of the NLRP3 Inflammasome in Central Nervous System Disorders. *Journal of Immunology Research*. 2016; 2016(8): 1-9. DOI:10.1155/2016/9238290.
20. Lepelley A., Ghosh S. Clean Up after Yourself. *Molecular Cell*. 2016; 61: 644-5.
21. Minassian B.A., Kalimo H. Autophagy in neuropathology. *Acta Neuropathologica*. 2015; 129(3): 333-5. DOI:10.1007/s00401-015-1396-1.
22. Nalamolu K.R., Smith N.J., Chelluboina B., Klopfenstein J.D., Pinson D.M., Wang D.Z. et al. Prevention of the Severity of Post-ischemic Inflammation and Brain Damage by Simultaneous Knockdown of Toll-like Receptors 2 and 4. *Neuroscience*. 2018; 289: 82-91.
23. Lopes-Pinheiro M.A., Kooij G., Mizze M.R., Kamermans A., Enzmann G., Lyck R. et al. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2016; 1862(3): 461-7.
24. Jin W.N., Gonzales R., Feng Y., Wood K., Chai Z., Dong J.F. et al. Brain Ischemia Induces Diversified Neuroantigen-Specific T-Cell Responses That Exacerbate Brain Injury. *Stroke*. 2018; 49 (6): 1471-8.
25. Gill D., Veltkamp R. Dynamics of T cell responses after stroke. *Current Opinion in Pharmacology*. 2016; 26: 26-32.
26. Becker K. Autoimmune Responses to Brain Following Stroke. *Transl. Stroke Res*. 2012; 3(3): 310-7.
27. Wang Z.K., Xue L., Wang T., Wang X.J., Su Z.Q. Infiltration of invariant natural killer T cells occur and accelerate brain infarction in permanent ischemic stroke in mice. *Neuroscience Letter*. 2016; (633): 62-8.
28. Kamel H., Iadecola C. Brain-Immune Interactions and Ischemic Stroke: Clinical Implications. *Arch. Neurol*. 2012; 69(5): 576-81.
29. Shukla V., Shakya A.K., Perez-Pinzon M.A. and Dave K.R. Cerebral ischemic damage in diabetes: an inflammatory perspective. *Journal of Neuroinflammation*. 2017; 14(21): 1-22. DOI:10.1186/s12974-016-0774-5.
30. Gong, Z., Pan, J., Shen, Q., Li M. and Peng Y. Mitochondrial dysfunction induces NLRP3 inflammasome activation during cerebral ischemia/reperfusion injury. *Journal of Neuroinflammation*. 2018; 15(242): 1-17. DOI:10.1186/s12974-018-1282-6.
31. Liu T., Tang Q., Liu K., Xie W., Liu X., Wang H. et al. TRIM11 Suppresses AIM2 Inflammasome by Degrading AIM2 via p62-Dependent Selective Autophagy. *Cell Reports*. 2016; (16): 1988-2002.
32. Hong P., Gu R., Li F., Xiong X.X., Liang W.B., You Z.J., Zhang H.F. NLRP3 inflammasome as a potential treatment in ischemic stroke concomitant with diabetes. *J. of Neuroinflammation*. 2019; 16(121): 1-13. DOI: 10.1186/s12974-019-1498-0.

IMMUNOLOGY

33. Zhong Z., Umemura A., Sanchez-Lopez E., Liang S., Shalpour S., Wong J. et al. NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell*. 2016; 164: 896–910.
34. Zhao J., Mou Y., Bernstock J.D., Klimanis D., Wang S., Spatz M., et al. Synthetic Oligodeoxynucleotides Containing Multiple TTAGGG Motifs Suppress Inflammasome Activity in Macrophages Subjected to Oxygen and Glucose Deprivation and Reduce Ischemic Brain Injury in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *PLoS ONE*. 2015; 10(10): e0140772. DOI: 10.1371/journal.pone.0140772.
35. Cordero M.D., De Miguel M., Moreno Fernández A.M., López I.C., Maraver J.G., Cotán D. et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease. *Arthritis Research and Therapy*. 2010; 12(R17): 1-11. DOI: <http://arthritis-research.com/content/12/1/R17>.
36. Guan R., Zou W., Dai X., Yu X., Liu H., Chen O., Teng W. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke. *Journal of Biomedical Science*. 2018; 25(87): 1-16. DOI:10.1186/s12929-018-0487-4.
37. Tang Y.C., Hong-Xia Tian H.X., Yi T. and Chen H.B. The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia. *Protein Cell*. 2016; 7(10): 699–713.
38. Goodall M.L., Fitzwalter B.E., Zahedi S., Wu M., Rodriguez D., Mulcahy-Levy J.M. et al. The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Developmental Cell*. 2016; (37): 337–49.
39. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1833(12): 3448-59. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
40. Chen Y., Chang C., Chen H., Hsieh C.-W., Tang K.-T., Yang M.-C. et al. Association between autophagy and inflammation in patients with rheumatoid arthritis receiving biologic therapy. *Arthritis Research and Therapy*. 2018; 20(268): 1-11. DOI: 10.1186/s13075-018-1763-0.
41. Clarke A.J., Ellinghaus U., Cortini A., Stranks A., Simon A.K. Botto M. et al. Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development. *Ann. Rheum. Dis*. 2015; 74: 912–20.
42. Liu J.N., Suh D.H., Trinh H.K., Chwae Y.J., Park H.S., Shin Y.S. The role of autophagy in allergic inflammation: a new target for severe asthma. *Exp. Mol. Med*. 2016; 48(7): e243. DOI:10.1038/emmm.2016.38.
43. Parzych K.R., Klionsky D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signa*. 2014; (20): 460–73.
44. Hundeshagen P., Hamacher-Brady A., Eils R. and Brady N.R. Concurrent detection of autolysosome formation and lysosomal degradation by flow cytometry in a high-content screen for inducers of autophagy. *BMC Biology*. 2011; 9(38): 1-15. DOI:10.1186/1741-7007-9-38.
45. Lee Y-K. and Lee J-A. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Reporst*. 2016; 49(8): 424-30.
46. Xia F., Deng C., Jiang Y., Qu Y., Deng J., Cai Z., et al. IL4 (interleukin-4) induces autophagy in B cells leading to exacerbated asthma. *Autophagy*. 2018; 14: 450–64.
47. Whang M.I., Tavares R.M., Benjamin D.I., Kattah M.G., Advincula R., Nomura D.K. et al. The ubiquitin binding protein TAX1BP1 mediates autophagosome induction and the metabolic transition of activated T cells. *Immunity*. 2017; (46): 405–20.
48. Willinger T, Flavell R.A. Canonical autophagy dependent on the class III phosphoinositide-3 kinase Vps34 is required for naive T-cell homeostasis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2012; (109): 8670–5.
49. Zhang Y., Morgan M.J., Chen K., Choksi S., Liu Z.G. Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation. *Blood*. 2012; (119): 2895–2905.
50. Nakagawa I., Amano A., Mizushima N., Yamamoto A., Yamaguchi H., Kamimoto T. et al. Autophagy Defends Cells Against Invading Group A Streptococcus. *Science*. 2004; 306(5698): 1037–40.
51. Di Y., He Y., Zhao T., Huang X., Wu K.W., Liu S.H. et al. Methylene Blue Reduces Acute Cerebral Ischemic Injury via the Induction of Mitophagy. *Mol. Med*. 2015; 21: 420–9.
52. Zhang X., Yuan Y., Jiang L., Zhang J., Gao J., Shen Z. et al. Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin protects against transient ischemic brain injury: involvement of PARK2-dependent mitophagy. *Autophagy*. 2014; (10): 1801–13.
53. Bjorkoy G., Lamark T., Brech A., Outzen H., Perander M., Øvervatn A. et al. 62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell. Biol*. 2005; 171(4): 603–14.
54. Lu N., Li X., Tan R., An J., Cai Z., Hu X. et al. HIF-1 α /Beclin1-Mediated Autophagy Is Involved in Neuroprotection Induced by Hypoxic Preconditioning. *J. Mol. Neurosci*. 2018; 66(2): 238–50. DOI:10.1007/s12031-018-1162-7.

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Багирова Н.С., Петухова И.Н., Григорьевская З.В.

КАНДИДЕМИЯ У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ: ОСОБЕННОСТИ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава РФ, 115522, Москва, Россия

Целью исследования было определение основных видов *Candida*, выделяемых из крови пациентов онкологического стационара, сравнение таксономической структуры штаммов, полученных при кандидемии у детей и взрослых. Всего за исследуемый период микробиологически (метод гемокультур) доказана кандидемия у 81 больного (повторы исключены), из них 29 (35,8%) – пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Общее количество изолятов, включенных в разработку, составило 82 штамма *Candida* spp. (10 видов). В целом в таксономической структуре кандидемий лидирует *C. parapsilosis* (60,97%), на втором месте – *C. albicans* (20,7%), на третьем – *C. glabrata* и *C. lusitaniae* – по 3,7% каждый вид, на четвертом – *C. krusei*, *C. guilliermondii* и *C. tropicalis* (по 2,4% каждый вид). *C. parapsilosis* статистически значимо чаще были выделены из крови по сравнению с *C. albicans* (61,0% против 20,7%, соответственно, $p < 0,0001$). Кандидемия была выявлена статистически значимо чаще у взрослых по сравнению с детьми (63,0% против 37,0%, соответственно, $p < 0,002$). Причем у взрослых статистически достоверно чаще из крови были выделены *C. parapsilosis* нежели *C. albicans* (70,6% против 15,7%, соответственно, $p < 0,0001$). У детей достоверных различий в частоте выделения *C. parapsilosis* и *C. albicans* не выявлено: доля *C. parapsilosis* составила 45,2%, *C. albicans* – 29,0%. Редкие виды у взрослых были выделены в 7,8% случаев, у детей – в 12,9% случаев, но статистически значимых различий по этому параметру выявлено не было. Доля *Candida non-albicans* составила в целом за исследуемый период 79,3%, и основным видом в этой группе является *C. parapsilosis* (76,9%).

Ключевые слова: кандидемия; фунгемиа; онкологическая клиника; *Candida* spp.; *Candida non-albicans*; таксономическая структура; рак.

Для цитирования: Багирова Н.С., Петухова И.Н., Григорьевская З.В. Кандидемия у онкологических больных: особенности таксономической структуры. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (7): 399-406. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-399-406>

Для корреспонденции: Багирова Наталья Сергеевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотр. микробиологической лаборатории; e-mail: nbagirova@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 28.01.2022

Принята к печати 19.04.2022

Опубликовано 18.07.2022

Bagirova N.S., Petukhova I.N., Grigorievskaya Z.V.

CANDIDEMIA IN CANCER PATIENTS: FEATURES OF THE TAXONOMIC STRUCTURE

Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115522, Moscow, Russia

The aim of the study was to determine the main *Candida* species isolated from blood of cancer patients, to compare the taxonomic structure of strains obtained from children and adults with candidemia. In total, during the study period, candidemia was microbiologically proven by blood culture in 81 patients (duplicates were excluded). Patients in the intensive care unit (ICU) accounted for 35,8%. The total number of isolates elaborated was 82 strains of 10 *Candida* species. In general, in the taxonomic structure of candidemias, *C. parapsilosis* (61.0%) predominates, *C. albicans* (20.7%) is in the second place, followed by *C. glabrata* and *C. lusitaniae* (3.7% each); *C. krusei*, *C. guilliermondii* and *C. tropicalis* (2.4% each). *C. parapsilosis* was statistically significantly often isolated from blood compared to *C. albicans* (61.0% versus 20.7%, respectively, $p < 0.0001$). Candidemia was statistically significantly more often detected in adults than in children (63.0% versus 37.0%, respectively, $p < 0.002$). Moreover, in adults, *C. parapsilosis* was statistically significantly more often isolated from blood than *C. albicans* (70.6% versus 15.7%, respectively, $p < 0.0001$). In children, there were no significant differences in the frequency of isolation of *C. parapsilosis* and *C. albicans*: the proportion of *C. parapsilosis* was 45.2%, *C. albicans* – 29.0%. Rare species were identified in 7.8% of cases in adults, and in 12.9% of cases in children without statistical difference ($p > 0.05$). The proportion of *Candida non-albicans* during the study period was 79.3%, and *C. parapsilosis* is the main species in this group (76.9%).

Key words: candidemia; fungemia; cancer hospital; *Candida* spp.; *Candida non-albicans*; taxonomic structure; cancer.

For citation: Bagirova N.S., Petukhova I.N., Grigorievskaya Z.V. Candidemia in cancer patients: features of the taxonomic structure. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (7): 399-406 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-399-406>

For correspondence: Bagirova Nataliya Sergeevna, Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher of the Microbiological Laboratory; e-mail: nbagirova@mail.ru

Information about authors:Bagirova N. S., <https://orcid.org/0000-0003-1405-3536>;Petukhova I.N., <https://orcid.org/0000-0003-3077-0447>;Grigorievskaya Z.V., <https://orcid.org/0000-0003-4294-1995>.**Conflict of interest.** *The authors declare that they have no conflicts of interest.***Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

Received 28.01.2022

Accepted 19.04.2022

Published 18.07.2022

Введение. Инвазивный кандидоз, в том числе кандидемия, по-прежнему остается значительной проблемой всемирного значения, и особенно в качестве инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [1-5].

Пациенты с ослабленным иммунитетом – это основная группа больных, у которых регистрируется инфекция кровотока, обусловленная *Candida spp.* Пациенты отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) составляют среди них значительную часть [2, 5-7]. На долю онкологических больных приходится до 35% инвазивных кандидозов, в том числе кандидемии, поскольку в данной группе пациентов сосредоточены все возможные факторы риска развития подобных осложнений, связанных как с основным заболеванием, так и вследствие проводимого специфического лечения [8].

Наиболее распространенные факторы риска – это тяжесть основного заболевания и длительное пребывание в ОРИТ, и основными факторами риска являются наличие центрального венозного катетера, обширные хирургические вмешательства (преимущественно торакальной и абдоминальной областей), при которых повторные лапаротомии или несостоятельность анастомозов усугубляют ситуацию. Также важнейшими факторами риска являются терапия антибиотиками, онкологические заболевания, острый панкреонекроз, проведение трансплантации и полное парентеральное питание [9-11]. По данным многих авторов, к основным факторам риска кандидемии также относят возраст <1 года или ≥65 лет, состояние нейтропении, длительную и массивную колонизацию кожи и слизистых оболочек пациента, хотя колонизацию, скорее всего, можно рассматривать как предпосылку (предварительное условие) для развития инвазивного кандидоза [12-19].

Однако факторы риска кандидемии несколько отличаются в различных группах пациентов, и в немалой степени зависят от профиля стационара, от стратегии ведения больных и эпидемиологических особенностей в конкретной клинике. Так, в проспективном многоцентровом исследовании в Швейцарии и Франции методом случай-контроль, в котором участвовали 5 университетских больниц и одна крупная клиническая больница, сравнивали факторы риска при кандидемии у взрослых пациентов старше 18 лет, находившихся в ОРИТ (44%) и в других отделениях (56%). Полное парентеральное питание, острое повреждение почек, заболевания сердца, предшествующий септический шок и воздействие аминогликозидных антибиотиков явились независимыми факторами риска кандидемии в популяции ОРИТ. В другой группе пациентов, не находившихся в ОРИТ, независимым фактором риска кандидемии тоже было полное парентеральное питание, но другими независимыми факторами риска были также центральный венозный катетер и терапия антибиотиками группы гликопептидов и нитроимидазолов [20].

Вероятно, некоторые генетические факторы связаны с предрасположенностью к развитию кандидемии. В настоящее время – это активная область исследований [21].

По данным 11-летнего международного ретроспективного исследования в Европе (23 медицинских центра из 10 стран), общая летальность при кандидемии у детей через 30 дней составила 14,4% и была выше среди пациентов ОРИТ по сравнению с детьми из других отделений [19]. Летальность при кандидемии у взрослых пациентов пока остается высокой, составляя от 46% до 60%, и в основном определяется тяжестью заболевания. Причем, пациенты хирургического профиля имеют более благоприятный исход кандидемии [4, 22].

Изучение таксономической структуры возбудителей кандидемии крайне важно, поскольку эффект от лечения теми или иными антифунгальными препаратами у различных видов *Candida* будет отличаться [23, 24]. Кроме того, состав основных возбудителей кандидемии подвержен изменению с течением времени [4].

Длительное время основным видом *Candida* при фунгемии был *C. albicans*, но в последние несколько десятков лет во всем мире в таксономической структуре кандидемии отмечается сдвиг в сторону иных видов кандид (*Candida non-albicans*, *CNA*) [25-27]. Наиболее обоснованным объяснением подобных изменений считается селективное давление антифунгальных препаратов азолового ряда (флуконазол и другие) [25, 28, 29].

В настоящее время шесть видов – *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* и *C. auris* – признаны основными возбудителями при кандидемии [30-33]. Несмотря на то, что *C. auris* стремительно распространяется по миру, не все страны регистрируют этот вид как возбудителя фунгемии, например, в Германии, Дании *C. auris* не выявлен. В крупном онкологическом Центре России в течение длительного периода наблюдений рост *C. auris* из крови также не получен [4, 27, 33].

Различия в эпидемиологических данных не только между разными странами, но и среди стационаров различного профиля, являются серьезной причиной проведения постоянного или периодического мониторинга таксономической структуры возбудителей при фунгемии в конкретном стационаре, поскольку это неразрывно связано с эффективностью антифунгальной терапии.

Материал и методы. Таксономическая структура возбудителей кандидемии проанализирована за период с января 2015 г. по декабрь 2021 г. Гемокультивирование в течение 5 сут проводили в 2-х микробиологических геманализаторах-инкубаторах (автоматизированная система непрерывного длительного мониторинга): BD BACTEC FX 400 (Becton Dickinson, США) и Vact/ALERT 3D (BioMerieux, Франция). Идентификация проводилась с использованием масс-спектрометрического

анализа белковой фракции микробной клетки на приборе MALDI-ToF Microflex LT (Biotyper, Bruker Daltonics, Германия).

Достоверность полученных результатов оценивали с помощью дисперсионного анализа с применением критерия Стьюдента. Достоверными считали различия с вероятностью не менее 95% ($p < 0,05$). Статистические расчеты производили по компьютерной программе, разработанной группой медицинской кибернетики НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ.

Результаты. Всего за исследуемый период кандидемия микробиологически доказана у 81 больного (повторы исключены). У одного пациента с интервалом в 1,5 месяца был получен рост разных видов *Candida*. С учетом этого общее количество штаммов, включенных в разработку, составило 82 (10 видов *Candida*). 20% (6/30) детей были в возрасте до 1 года. Средний возраст детей составил 11 лет (от 1 года до 17 лет). Всего было 16 мальчиков, средний возраст 7 лет (от 1 года до 16 лет) и 14 девочек, средний возраст 7 лет (от 1 года до 17 лет). Среди взрослых пациентов 2,5 % были в возрасте 65 лет

и более. Средний возраст взрослых пациентов составил 50 лет (от 25 до 86 лет). Всего было 23 пациента мужского пола, средний возраст 48 лет (от 24 до 83 лет) и 28 пациентов женского пола, средний возраст 52 года (от 23 до 86 лет). Из 81 больного 29 (35,8%) – пациенты ОРИТ. Случаи кандидемии статистически значимо чаще регистрировались у взрослых по сравнению с детьми (51/81, 63,0% против 30/81, 37,0%, соответственно, $p < 0,002$) (табл. 1).

Практически у всех пациентов были установлены ВСУ, но у 64 пациентов (79 %) до дня микробиологически доказанной фунгемии эти устройства функционировали свыше 14 дней: дети – 66,7% (20/30), взрослые – 86,3% (44/51). Обширные хирургические вмешательства (преимущественно в абдоминальной и торакальной областях) у 71,6% пациентов предшествовали кандидемии. Статистически значимо чаще кандидемия регистрировалась у пациентов хирургического профиля и ОРИТ среди взрослых по сравнению с детьми (86,3% против 46,7% и 49,0% против 13,3%, соответственно, $p < 0,001$). Онкогематологические пациенты с кандидемией статистически значимо чаще регистрировались

Таблица 1

Характеристика онкологических пациентов с микробиологически доказанным эпизодом кандидемии (2015–2021гг., ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ)

Характеристика	Дети, всего/%	Взрослые, всего/%	$p <$	Всего/%
Кандидемия	30/37,0	51/63,0	0,002	81/100
Возраст, годы				
0-1	6/20,0	-	-	6/7,4
65 и более	-	12/25,5	-	12/14,8
Женщины	14/46,7	28/54,9	$>0,05$	42/51,9
Мужчины	16/53,3	23/45,1	$>0,05$	39/48,1
ОРИТ	4/13,3	25/49,0	0,001	29/35,8
Онкогематология:	16/53,3	3/5,9	0,0001	19/23,5
ОЛЛ	12/40,0	-	-	12/14,8
ОМЛ	4/13,3	3/5,9	$>0,05$	7/8,6
Фебрильная нейтропения	13/43,3	8/15,7	0,02	21/25,9
Хирургический профиль	14/46,7	44/86,3	0,001	58/71,6
Химиотерапевтический профиль (кроме онкогематологии)	-	4/7,8	-	4/4,9
Установлено ВСУ	30/100	51/100	-	81/100
ВСУ (длительность до фунгемии):				
менее 14 дней	10/33,3	7/13,7	$>0,05$	17/21,0
14 дней и более	20/66,7	44/86,3	$>0,05$	64/79,0
Антибактериальная терапия (≥ 14 дней до фунгемии)	22/73,3	29/56,9	$>0,05$	51/63,0
Антифунгальные препараты (≥ 14 дней до фунгемии)	12/40,0	10/19,6	$>0,05$	22/27,2
Колонизация (от 1 и более локусов)	18/60,0	27/52,9	$>0,05$	45/55,6
Множественная предшествующая госпитализация	10/33,3	14/27,5	$>0,05$	24/29,6
Искусственная вентиляция легких свыше 5 дней	2/6,7	8/15,7	$>0,05$	10/12,3
Катетер-ассоциированная инфекция	8/26,7	12/23,5	$>0,05$	20/24,7
Летальный исход (общая летальность)	5/16,7	10/19,6	$>0,05$	15/18,5

Примечание. ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ОМЛ – острый миелобластный лейкоз; ВСУ – внутрисосудистое устройство; ИВЛ – искусственная вентиляция легких; КАИ – катетер-ассоциированная инфекция.

MICROBIOLOGY

среди детей в сравнении со взрослыми (53,3% против 5,9%, соответственно, $p < 0,0001$), и фебрильная нейтропения также наблюдалась достоверно чаще у детей, нежели у взрослых (43,3% против 15,7%, соответственно, $p < 0,02$). Многократная госпитализация, предшествующая кандидемии, регистрировалась у 29,6% пациентов. Более половины пациентов были колонизированы *Candida* spp. (мазки из полости рта, ануса, моча, кожа, катетер). Антибактериальная терапия не менее чем за 2 недели до микробиологически подтвержденной фунгемии была у 63,0% пациентов, причем статистически значимых различий у детей (73,3%) по сравнению со взрослыми (56,9%) не выявлено. Антифунгальные препараты были назначены в 27,2% случаев, не менее, чем за 2 нед до микробиологически подтвержденной фунгемии: дети – 40,0%, взрослые – в 2 раза реже (19,6%). Летальный исход (общая летальность) до 30 дней от дня микробиологически подтвержденной фунгемии в целом составил 18,5%. 5 пациентов с летальным исходом – дети (16,7%), причем все из отделения химиотерапии гемобластозов, старше 1 года, 3 девочки и 2 мальчика; 10 (19,6%) пациентов – взрослые, причем все после обширных хирургических вмешательств, половина – в возрасте 65 лет и старше.

В целом в таксономической структуре кандидемии лидирует *C. parapsilosis* (61,0%), на втором месте – *C. albicans* (20,7%), на третьем – *C. glabrata* и *C. lusitaniae* – по 3,7% каждый вид, на четвертом – *C. krusei*, *C. guilliermondii* и *C. tropicalis* (по 2,4% каждый вид) (табл. 2).

Группа *CNA* при кандидемии регистрируется статистически значимо чаще, чем *C. albicans* в течение всего периода наблюдений (79,3%, 65/82, против 20,7%, 17/82, соответственно, $p < 0,0001$). *C. parapsilosis* – основной вид, составляющий группу *CNA*. Такая ситуация наблюдалась и в прошлые годы. Так, по результатам предыдущего мониторинга [27] доля *CNA* составляла 78,5%. В последние 2 года доля *CNA* заметно снизилась (рис. 1).

За семилетний период наблюдений *C. parapsilosis* статистически значимо чаще были выделены из крови по сравнению с *C. albicans* (61,0% против 20,7%, соот-

ветственно, $p < 0,0001$). В то же время следует отметить, что в течение последних 2х лет оба вида стали регистрироваться с одинаковой частотой: в 2020 и 2021 гг. – по 33,3% % каждый вид. Если доля кандидемии, обусловленной *C. albicans*, на протяжении исследуемого периода мало изменялась, то частота выделения *C. parapsilosis* заметно снизилась к 2018 году (рис. 2).

C. parapsilosis из крови были выделены у взрослых статистически достоверно чаще, нежели *C. albicans* (36/51, 70,6% против 8/51, 15,7%, соответственно, $p < 0,0001$). У детей достоверных различий в частоте выделения *C. parapsilosis* и *C. albicans* не получено: доля *C. parapsilosis* составила 45,2% (14/31), *C. albicans* – 29,0% (9/31). Кроме того, *C. parapsilosis* статистически значимо чаще были выделены из крови у взрослых по сравнению с детьми (36/51, 70,6% против 14/31, 45,2%, соответственно, $p < 0,02$).

Всего было 5 редких видов *Candida*: *C. utilis*, *C. inconspicua*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* и *C. dubliniensis*. Редкие виды у взрослых были выделены в 7,8% (4/51) случаев, у детей – в 12,9% (4/31) случаев, но статистически значимых различий по этому параметру выявлено не было (табл. 3).

Обсуждение. Наше исследование определило два главных возбудителя при кандидемии в онкологическом стационаре: *C. parapsilosis* (61,0%) и *C. albicans* (20,7%), причем, как у детей, так и у взрослых. Интересно, что по данным предыдущего мониторинга доля *C. parapsilosis* составляла 51,1% [27]. По данным Eleni Vasileiou и соавт. [31], у педиатрических пациентов со злокачественными новообразованиями в семи онкогематологических отделениях и в отделении трансплантации стволовых клеток в Греции в течение 2015–2019 гг. основным патогеном при кандидемии также является *C. parapsilosis*, на втором месте – *C. albicans*. В то же время во взрослой популяции, также по данным авторов из Греции, такого резкого отличия не наблюдается: *C. parapsilosis* – 37%, *C. albicans* – 41% [32]. В Германии, напротив, на долю *C. albicans* приходится 60,9%, а на *C. parapsilosis* – только 6,6% [4]. В рамках национальной программы эпиднадзора в Дании

Таблица 2

Таксономическая структура возбудителей при кандидемии в течение 7 лет (дети и взрослые)

Вид <i>Candida</i>	Годы, количество штаммов/%							Всего штаммов/%
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	
<i>C. albicans</i>	3	3	1	3	2	2	3	17/20,7
<i>C. parapsilosis</i> *	8	20	8	5	4	2	3	50/61,0*
<i>C. glabrata</i>	0	0	0	1	0	0	2	3/3,7
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	0	1	1	0	0	2/2,4
<i>C. lusitaniae</i>	0	0	0	1	2	0	0	3/3,7
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	2	0	2/2,4
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	1	0	1	2/2,4
<i>C. dubliniensis</i>	0	0	1	0	0	0	0	1/1,2
<i>C. utilis</i>	0	0	1	0	0	0	0	1/1,2
<i>C. inconspicua</i>	0	1	0	0	0	0	0	1/1,2
Итого	11	24	11	11	10	6	9	82/100

Примечание. * – *C. parapsilosis* статистически значимо чаще выделены из крови по сравнению с *C. albicans* ($p < 0,0001$) и прочими видами *Candida*.

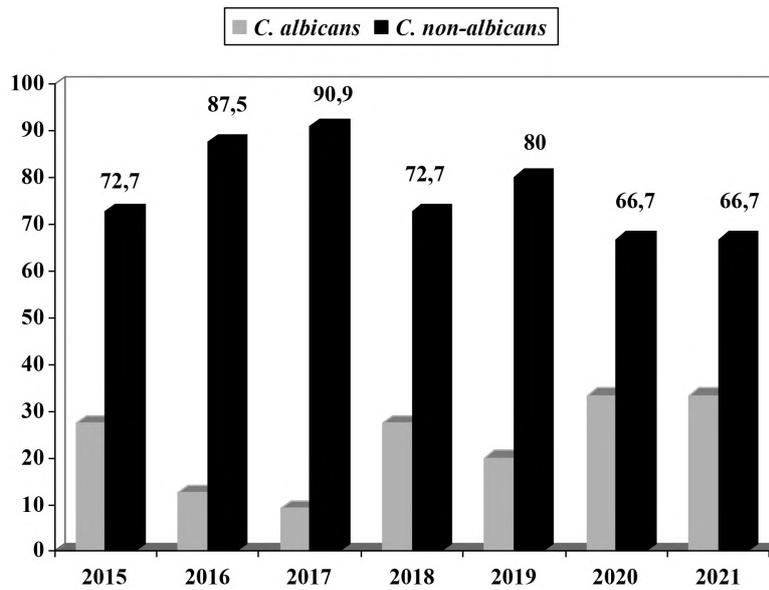


Рис. 1. Соотношение *C. albicans* и *C. non-albicans* при кандидемии за 2015-2021 гг.

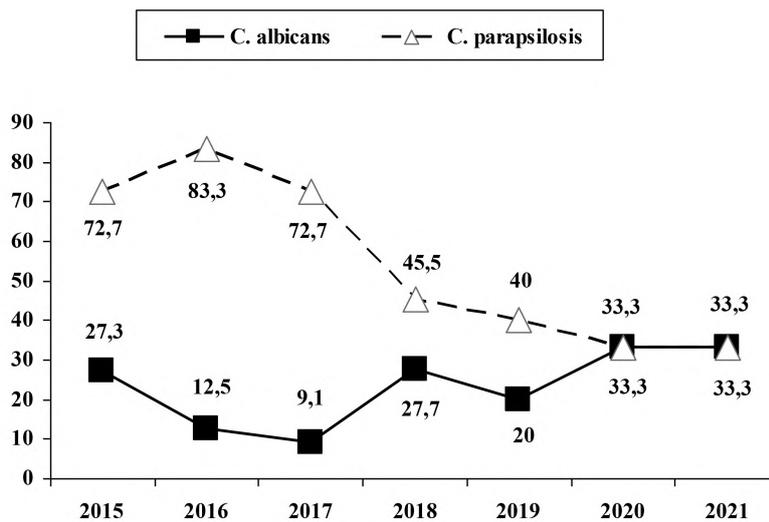


Рис. 2. Динамика частоты высеваемости лидирующих видов *Candida* из крови.

Таблица 3

Различия в таксономической структуре возбудителей кандидемии взрослых и детей

Вид <i>Candida</i>	Дети	Взрослые
<i>C. albicans</i>	9/29,0	8/15,7
<i>C. parapsilosis</i>	14/45,2	36/70,6
<i>C. glabrata</i>	1/3,2	2/3,9
<i>C. krusei</i>	1/3,2	1/2,0
<i>C. tropicalis</i>	2/6,5	0
<i>C. guilliermondii</i>	1/3,2	1/2,0
<i>C. dubliniensis</i>	0	1/2,0
<i>C. utilis</i>	0	1/2,0
<i>C. lusitaniae</i>	3/9,7	0
<i>C. inconspicua</i>	0	1/2,0
Итого	31/100	51/100

[33] были прослежены изменения в таксономической структуре возбудителей кандидемии в течение четырех периодов: 2004–2007 гг., 2008–2011 гг., 2012–2015 гг. и 2016–2018 гг. (1454 штаммов). На *C. albicans* приходилось 42,1% всех изолятов, а на *C. glabrata* – 32,1%. В течение четырех указанных выше периодов доля *C. albicans* снизилась ($p < 0,001$), а доля *C. glabrata* увеличилась ($p < 0,001$), и что важно, распределение видов продолжало смещаться в сторону увеличения доли *C. glabrata* и уменьшения доли *C. albicans* (даже ниже 40% в 2017 г.). В нашем исследовании доля *C. glabrata* составила всего 3,7%, причем численного увеличения этого вида в течение исследуемого периода мы не наблюдали (см. табл. 2).

Интересно, что о такой низкой частоте выделения из крови *C. albicans*, как в нашем исследовании, не сообщалось, хотя доля *C. albicans* менее 40% наблюдалась в США и Южной Америке [5, 34-37], в странах же Северной Европы частота выделения *C. albicans* из крови была не ниже 50% [38-41].

Таксономическая структура возбудителей кандидемии во всем мире изменяется с течением времени по разным причинам: появление новых антифунгальных препаратов, отличия в тактике лечения и профилактики, введение новых методов диагностики и терапии онкологических заболеваний и проч. Перераспределение значения основных видов *Candida* в качестве возбудителей при кандидемии неразрывно связано с успехом или неудачей в лечении как данного инфекционного осложнения, так и основного заболевания, особенно у ослабленных пациентов.

Повсеместно наблюдается процесс изменения пропорции в сторону появления видов *Candida*, отличных от *C. albicans* (CNA). Зачастую эти штаммы отличаются сниженной чувствительностью к антифунгальным препаратам. Низкая эффективность антимикотических средств в отношении CNA связана с терапией препаратами азолового ряда (особенно с флуконазолом), которая предшествовала кандидемии [28, 42, 43].

В нашем исследовании отмечается весьма значительная доля CNA в структуре кандидемии, составляющая в целом за исследуемый период 79,3%, что не противоречит данным, поступающим из других регионов мира, где также отмечается рост случаев кандидемии, обусловленной CNA, но в значительно меньших масштабах. Так, в итальянском многоцентровом исследовании CNA составили 59,8% [26], а в США – 57,9% [25]. Мы предполагаем, что сдвиг в таксономической структуре возбудителей кандидемии в нашем стационаре в сторону значительного увеличения видов, относящихся к CNA, обусловлен длительным периодом применения флуконазола как для профилактики, так и для терапии грибковых инфекционных осложнений у онкологических больных. Ввиду отсутствия патогномичных клинических признаков инвазивного микоза, в том числе и кандидоза, врач назначает эмпирически антифунгальный препарат, поскольку из-за агрессивных методов диагностики и лечения основного заболевания велика вероятность присоединения грибковой инфекции, которая без своевременной и адекватной терапии может закончиться неблагоприятным исходом. *C. parapsilosis* – основной вид в группе CNA, составивший 76,9% (50/65) всех видов этой группы. Частота выделения *C. parapsilosis* снизилась за последние 4 года (см. рис. 2). Впрочем, частота случаев кандидемии, подтвержденной микробиологически, также снизилась, что можно

объяснить более осторожным и обоснованным назначением антифунгальных препаратов для профилактики и терапии инвазивных микозов, а также введением антимикотических препаратов других классов (эхинокандины) в практику.

У взрослых пациентов кандидемия чаще регистрировалась после хирургических вмешательств (86,3%, $p < 0,001$) и в ОРИТ (49,0%, $p < 0,001$), тогда как в детской популяции пациентов микробиологически подтвержденная кандидемия чаще выявлялась у онкогематологических больных (53,3%, $p < 0,0001$) и при фебрильной нейтропении (43,3%, $p < 0,02$). По полу, возрасту, длительности использования внутрисосудистого катетера, колонизации, по факту многократной предшествующей госпитализации и назначения антибактериальной терапии статистически значимых различий у детей и взрослых не наблюдалось.

Выводы

1. Определены два основных возбудителя при кандидемии в онкологическом стационаре: *C. parapsilosis* (61,0%) и *C. albicans* (20,7%), причем как у детей, так и у взрослых.

2. Установлено, что доля *Candida non-albicans* составила в целом за исследуемый период 79,3% (65/82), и *C. parapsilosis* (76,9%) является основным видом в этой группе.

3. За последние 4 года частота выделения *C. parapsilosis* и количество случаев кандидемии, подтвержденной микробиологически, снизились.

4. В целом кандидемия была выявлена статистически значимо чаще у взрослых по сравнению с детьми (63,0% против 37,0%, соответственно, $p < 0,002$).

5. У взрослых пациентов статистически достоверно чаще из крови были выделены *C. parapsilosis* нежели *C. albicans* (36/51, 70,6% против 8/51, 15,7%, соответственно, $p < 0,0001$). У детей достоверных различий в частоте выделения *C. parapsilosis* и *C. albicans* не получено: доля *C. parapsilosis* составила 45,2%, *C. albicans* – 29,0%.

6. Редкие виды у взрослых были выделены в 7,8% случаев, у детей – в 12,9% случаев, но статистически значимых различий по этому параметру выявлено не было.

7. У взрослых пациентов кандидемия чаще регистрировалась после хирургических вмешательств ($p < 0,001$) и в ОРИТ ($p < 0,001$), тогда как в детской популяции кандидемия чаще выявлялась у онкогематологических больных ($p < 0,0001$) и при фебрильной нейтропении ($p < 0,02$).

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-7, 9-26, 28-43 см. REFERENCES)

- Шагдилеева Е.В., Рауш Е.Р., Богомолова Т.С., Васильева Н.В., Климо Н.Н. Результаты исследования инвазивного кандидоза в Санкт-Петербурге. *Проблемы медицинской микологии*. 2015; 17(2):148-9.
- Багирова Н.С., Дмитриева Н.В. Кандидемия у онкологических больных: таксономическая структура и резистентность к флуконазолу и вориконазолу *in vitro*. *Лабораторная служба*. 2017; 6(3): 182-9. DOI: 10.17116/labs201763182-189.

REFERENCES

- Kett D.H., Azoulay E., Echeverria P.M., Vincent J.L. Extended Prevalence of infection in ICUSGOI. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. *Crit. Care Med*. 2011; 39(4):665–70. DOI:10.1097/CCM.0b013e318206c1ca.

2. Bassetti M., Giacobbe D.R., Vena A., Trucchi C., Ansal di F., Antonelli M. et al. Incidence and outcome of invasive candidiasis in intensive care units (ICUs) in Europe: results of the EUCANDICU project. *Crit. Care*. 2019; 23(1):219. DOI:10.1186/s13054-019-2497-3.
3. Koehler P., Stecher M., Cornely O.A. Morbidity and mortality of candidemia in Europe: An epidemiologic meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019; 25:1200–12. DOI:10.1016/j.cmi.2019.04.024.
4. M. Schroeder, T. Weber, T. Denker, S. Winterland, D. Wichmann, H. Rohde, A.-K. Ozga, M. Fischer and S. Kluge. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia in critically ill patients in Germany: a single-center retrospective 10-year analysis. *Ann. Intensive Care*. 2020; 10:142. DOI:10.1186/s13613-020-00755-8.
5. Tsay S.V., Mu Y., Williams S., Epton E., Nadle J., Bamberg W.M., Barter D.M. et al. Burden of candidemia in the United States 2017. *Clin. Infect. Dis.* 2020 Dec 3; 71(9):e449–e453. DOI:10.1093/cid/ciaa193.
6. Luzzati R., Merelli M., Ansal di F., Rosin C., Azzini A., Cavinato S. et al. Nosocomial candidemia in patients admitted to medicine wards compared to other wards: a multicentre study. *Infection*. 2016; 44(6):747–55. DOI:10.1007/s15010-016-0924-9.
7. Schwab F., Geffers C., Behnke M., Gastmeier P. ICU mortality following ICU-acquired primary bloodstream infections according to the type of pathogen: a prospective cohort study in 937 Germany ICUs (2006–2015). *PLoS ONE*. 2018; 13(3):e0194210. DOI:10.1371/journal.pone.0194210.
8. Shagdileeva Ye.V., Raush Ye.R., Bogomolova T.S., Vasil'yeva N.V., Klimko. N.N. Results of a study of invasive candidiasis in St. Petersburg. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2015; 17(2):148–9. (in Russian)
9. Carmon M., Rimon B., Freund H.R. *Candida* sepsis during total parenteral nutrition: An endogenous infection indicating the severity of patients' disease state. *Clin Nutr.* 1992 Aug; 11(4):240–3. DOI:10.1016/0261-5614(92)90033-m.
10. Pongrácz J., Juhász E., Iván M., Kristóf K. Significance of yeasts in bloodstream infection: Epidemiology and predisposing factors of Candidemia in adult patients at a university hospital (2010–2014). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2015 Sep; 62(3):317–29. DOI:10.1556/030.62.2015.3.9.
11. Tadeo L., Talarmin J.P., Gastinne T., Bretonnière C., Miegerville M., Le Pape P., Morio F. Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study. *Mycoses*. 2016 May; 59(5):296–303. DOI:10.1111/myc.12470.
12. Nucci M., Anaissie E. Revisiting the source of candidemia: Skin or gut? *Clin. Infect. Dis.* 2001; 33(12): 1959–67. DOI:10.1086/323759.
13. Pammi M., Holland L., Butler G., Gacser A., Bliss J.M. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2013; 32(5):e206–e216. DOI:10.1097/INF.0b013e3182863a1c.
14. Kullberg B.J., Arendrup M.C. Invasive Candidiasis. *N. Engl. J. Med.* 2015 Oct 08; 373(15):1445–56. DOI:10.1056/NEJMra1315399.
15. Li D., Xia R., Zhang Q., Bai C., Li Z., Zhang P. Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of China: An 8-year case-control study. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17:536. DOI:10.1186/s12879-017-2636-x.
16. McCarthy M.W., Walsh T.J. Prophylactic measures during induction for acute myeloid leukemia. *Curr. Oncol. Rep.* 2017; 19(3):18. DOI:10.1007/s11912-017-0574-9.
17. Lausch K.R., Schultz D.K.H., Callesen M.T. Pediatric candidemia epidemiology and morbidities: A nationwide cohort. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2019; 38(5):464–9. DOI:10.1097/INF.0000000000002207.
18. Novosad S.A., Fike L., Dudeck M.A., Allen-Bridson K., Edwards J.R., Edens C. et al. Pathogens causing central-line-associated bloodstream infections in acute-care hospitals—United States, 2011–2017. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2020; 41(3):313–9. DOI: 10.1017/ice.2019.303.
19. Warris A., Pana Z.D., Oletto A., Lundin R., Castagnola E., Lehrnbecher T., Groll A.H., Roilides E. Etiology and outcome of candidemia in neonates and children in Europe: An 11-year multinational retrospective study. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2020; 39:114–20. DOI:10.1097/INF.0000000000002530.
20. Poissy J., Damonti L., Bignon A., Khanna N., Kietzell M. V., Boggian K. et al. The FUNGINOS and Allfun French Study Groups. Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. *Critical Care*. 2020; 24(1):2–11. DOI:10.1186/s13054-020-2766-1.
21. Andres L., Carpio M., Climaco A. *Fungemia Candidiasis*. Last Update: August 12, 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK436012/#article-18810.s4>.
22. Li Y., Du M., Chen L.A., Liu Y., Liang Z. Nosocomial Bloodstream Infection Due to *Candida* spp. in China: Species Distribution, Clinical Features, and Outcomes. *Mycopathologia*. 2016 Aug; 181(7–8):485–95. DOI:10.1007/s11046-016-9997-3. Epub. 2016 Mar 19].
23. Fournier P., Schwebel C., Maubon D., Vesin A., Lebeau B., Foroni L. et al. Antifungal use influences *Candida species* distribution and susceptibility in the intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011; 66:2880–6. DOI:10.1093/jac/dkr39.
24. Bailly S., Maubon D., Fournier P., Pelloux H., Schwebel C., Chapuis C. et al. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. – Trends over 10 years. *J. Infect.* 2016 Jan; 72(1):103–11. DOI:10.1016/j.jinf.2015.09.041. Epub. 2015 Oct 28. PMID: 26518058.
25. Pfaller M., Neofytos D., Diekema D., Azie N., Meier-Kriesche H.U., Quan S.P. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance(R)) registry, 2004–2008. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 74(4):323–31. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.003.
26. Montagna M.T., Caggiano G., Lovero G., De Giglio O., Coretti C., Cuna T. et al. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection*. 2013; 41(3):645–53. DOI:10.1007/s15010-013-0432-0.
27. Bagirova N.S., Dmitriyeva N.V. Candidemia in cancer patients: taxonomic structure and resistance to fluconazole and voriconazole in vitro. *Laboratornaya sluzhba*. 2017; 6(3):182–9. DOI:10.17116/labs201763182-189. (in Russian)
28. Blot S., Janssens R., Claeys G., Hoste E., Buyle F., De Waele J.J. et al. Effect of fluconazole consumption on long-term trends in candidal ecology. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58:474–7. DOI:10.1093/jac/dkl241.
29. Lortholary O., Desnos-Ollivier M., Sitbon K., Fontanet A., Bretagne S., Dromer F. et al. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2441 patients. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*. 2011; 55(2):532–8. DOI:10.1128/AAC.01128-10.
30. McCarthy M.W., Walsh T.J. Candidemia in the cancer patient: Diagnosis, treatment, and future directions. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 2018; 16:849–54. DOI:10.1080/14787210.2018.1536546.
31. Vasileiou E., Paisiou A., Tsipou C., Pourtsidis A., Galani V., Katzilakis N. et al. Candidemia in Children with Malignancies: Report from the Infection Working Group of the Hellenic Society of Pediatric Hematology-Oncology. *J. Fungi*. 2020; 6:276; DOI:10.3390/jof6040276.
32. Siopi M., Tarpatzi A., Kalogeropoulou E., Damianidou S., Vasiliakopoulou A., Vouli S. et al. Epidemiological Trends of Fungemia in Greece with a Focus on Candidemia during the Recent Financial Crisis: a 10-Year Survey in a Tertiary Care Academic Hospital and Review of Literature. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2020 Feb 21; 64(3):e01516-9. DOI:10.1128/AAC.01516-19.
33. Risum M., Astvad K., Johansen H.K., Schonheyder H.C., Rosenvinge F., Knudsen J.D. et al. Update 2016–2018 of the Nationwide Danish Fungaemia Surveillance Study: Epidemiologic Changes in a 15-Year Perspective. *J. Fungi*. 2021; 7:491. DOI:10.3390/jof7060491.
34. Doi A.M., Pignatari A.C.C., Edmond M.B., Marra A.R., Camargo L.F.A., Siqueira, R.A. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS ONE*. 2016; 11(1):e0146909. DOI:10.1371/journal.pone.0146909.

MICROBIOLOGY

35. Toda M., Williams S.R., Berkow E.L., Farley M.M., Harrison L.H., Bonner L. et al. Population-Based Active Surveillance for Culture-Confirmed Candidemia – Four Sites, United States, 2012–2016. *MMWR Surveill. Summ.* 2019; 6(8):1–15. DOI:10.15585/mmwr.ss6808a1.
36. Santolaya M.E., Thompson L., Benadof D., Tapia C., Legarraga P., Cortés C. et al. A prospective, multi-center study of candida bloodstream infections in Chile. *PLoS ONE.* 2019; 14(3):e0212924. DOI:10.1371/journal.pone.0212924.
37. Zhang A.Y., Shrum S., Williams S., Petnic S., Nadle J., Johnston H. et al. The Changing Epidemiology of Candidemia in the United States: Injection Drug Use as an Increasingly Common Risk Factor – Active Surveillance in Selected Sites, United States, 2014–2017. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 71(7):1732–7. DOI:10.1093/cid/ciz1061.
38. Asmundsdottir L.R., Erlendsdottir H., Gottfredsson M. Nationwide study of candidemia, antifungal use, and antifungal drug resistance in Iceland, 2000 to 2011. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(3):841–8. DOI:10.1128/JCM.02566-12.
39. Hesstvedt L., Gaustad P., Andersen C.T., Haarr E., Hannula R., Haukland H.H. et al. Twenty-two years of candidaemia surveillance: Results from a Norwegian national study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21:938–45. DOI:10.1016/j.cmi.2015.06.008.
40. Klingspor L., Ullberg M., Rydberg J., Kondori N., Serrander L., Swanberg J. et al. Epidemiology of fungaemia in Sweden: A nationwide retrospective observational survey. *Mycoses.* 2018; 61(10):777–85. DOI:10.1111/myc.12816.
41. Ala-Houhala M., Valkonen M., Kolho E., Friberg N., Anttila V.J. Clinical and microbiological factors associated with mortality in candidemia in adult patients 2007–2016. *Infect. Dis.* 2019; 51(11):824–30. DOI:10.1080/23744235.2019.1662941.
42. Blot S., Vandewoude K., Hoste E., Poelaert J., Colardyn F. Outcome in critically ill patients with candidal fungaemia: *Candida albicans* vs *Candida glabrata*. *J. Hosp. Infect.* 2001; 47(4):308–13. DOI:10.1053/jhin.2000.0918.
43. Goemaere B., Becker P., Van Wijngaerden E., Maertens J., Spriet I., Hendrickx M., Lagrou K. Increasing candidaemia incidence from 2004 to 2015 with a shift in epidemiology in patients preexposed to antifungals. *Mycoses.* 2018 Feb; 61(2):127-33. DOI:10.1111/myc.12714. Epub 2017 Nov 15. PMID: 29024057.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Чеснокова М. Г.^{1,2}, Чесноков В. А.³, Миронов А. Ю.^{4,5}, Блесман А. И.⁶, Полонянкин Д. А.²

АНАЛИЗ МИКРОРЕЛЬЕФА БИОПЛЁНКИ ГРИБОВ *CANDIDA ALBICANS* БАЗИСНЫХ ПЛАСТМАСС МЕТОДОМ ЛАЗЕРНОЙ МОДУЛЯЦИОННОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 644099, Омск, Россия;

²ФГБОУ «Омский государственный технический университет» Министерства науки и высшего образования, 644050, Омск, Россия;

³БУЗОО ГСП № 4, 644030, Омск, Россия;

⁴ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

⁵Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, 125371, Москва, Россия;

⁶Совет по профессиональным квалификациям в нанотехнологической промышленности, 117036, Москва, Россия

*Развитие микотической колонизации базисной поверхности с дальнейшей биодеструкцией акриловых пластмасс представляет в настоящее время несомненный интерес. Полость рта является благоприятной экологической нишей для колонизации грибами и последующей возможной их инвазии в эпителий слизистой оболочки полости рта. Метод модуляционной интерференционной лазерной микроскопии представляет значительный интерес исследователей в медицине в контексте получения необходимой информации о морфологических особенностях клеток микроорганизмов и сообщества микробиома в целом при колонизации определённой экологической ниши в организме человека. Цель исследования: провести анализ микро рельефа биоплёнки грибов *Candida albicans* базисных пластмасс горячего типа полимеризации при применении метода лазерной модуляционной интерференционной микроскопии. Проведено экспериментальное исследование с целью изучения биоплёнок грибов рода *Candida* на образцах базисных пластмасс, получено изображение биоплёнки грибов *Candida albicans* на поверхности пластмассы горячего типа полимеризации в визуализации фазового портрета, описана её горизонтальная и вертикальная структура, определены количественные характеристики рассматриваемого биопрофиля. Установлено неоднородное строение биоплёнки, обусловленное различной плотностью и скоплением клеток по поверхности, а также характеристики поверхности в соответствии с критериями шероховатости. Параметры микро рельефа на отдельно произвольно выбранной линии сечения позволяют определить характеристику биоплёнки в необходимом участке и дают возможность судить о характере её формирования в определённой биологической нише.*

Ключевые слова: биоплёнка; лазерная модуляционная интерференционная микроскопия; дрожжеподобные грибы; образцы базисных пластмасс; съёмные протезы.

Для цитирования: Чеснокова М. Г., Чесноков В. А., Миронов А. Ю., Блесман А. И., Полонянкин Д. А. Анализ микро рельефа биоплёнки грибов *Candida albicans* базисных пластмасс методом лазерной модуляционной интерференционной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (7): 407-413. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-407-413>

Для корреспонденции: Чеснокова Марина Геннадьевна, д-р мед. наук, проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии; e-mail: chesnokova_marin@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.01.2022

Принята к печати 20.04.2022

Опубликовано 18.07.2022

Chesnokova M. G.^{1,2}, Chesnokov V. A.³, Mironov A. Yu.⁴, Blesman A. I.², Polonyankin D. A.²

ANALYSIS OF MICRO-RELIEF OF BIOFILM OF YEAST *CANDIDA ALBICANS* SPECIES OF BASIC PLASTICS BY THE METHOD OF LASER MODULATION INTERFERENCE MICROSCOPY

¹FGBOU VO «Omsk State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 644099, Omsk, Russia;

²FGBOU VO «Omsk State Technical University», of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, 644050, Omsk, Russia;

³BUZOO GSP No. 4, 644030, Omsk, Russia;

⁴FBUN G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology. Rosпотребнадзор, 125212, Moscow, Russia;

⁵Federal scientific and clinical center for specialized types of medical care and medical technologies FMBA, 125371, Moscow, Russia;

⁶Council for Vocational Qualifications in the Nanotechnology Industry, 125212, Moscow, Russia

*The development of mycotic colonization of the base surface with further biodegradation of acrylic plastics is currently of undoubted interest. The oral cavity is a favorable ecological niche for colonization by fungi and their subsequent possible invasion into the epithelium of the oral mucosa. The method of modulation interference laser microscopy is of considerable interest to researchers in medicine in the context of obtaining the necessary information about the morphological characteristics of microbial cells and the microbiome community as a whole during the colonization of a certain ecological niche in the human body. Purpose of the study: to analyze the microrelief of the biofilm of yeast-like fungi of the species *Candida albicans* of base plastics of the hot type of polymerization using the method of laser modulation interference microscopy. An experimental study was carried*

in order to study biofilms of yeast-like fungi of the genus *Candida* on samples of basic plastics, an image of a biofilm of yeast-like fungi of the species *Candida albicans* was obtained on the surface of a plastic of a hot type of polymerization (polymethyl methacrylate) in the visualization of the phase portrait, a description of its horizontal and vertical bioprofile. As a result of the research, the heterogeneous structure of the biofilm was determined, due to the different density and accumulation of cells along the surface, the characteristics of the surface were established in accordance with the roughness criteria. The microrelief parameters on a separately arbitrarily selected section line allow one to determine the characteristics of the biofilm in the required area and make it possible to judge the nature of its formation in a certain biological niche.

Key words: *biofilm; laser modulation interference microscopy; yeast-like mushrooms; samples of base plastics; removable dentures.*

For citation: Chesnokova M. G., Chesnokov V. A., Mironov A. Yu., Blesman A. I., Polonyankin D. A. Analysis of micro-relief of biofilm of yeast *Candida albicans* of basic plastics by the method of laser modulation interference microscopy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (7): 407-413 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-407-413>

For correspondence: Chesnokova Marina Gennad'evna, doctor of medicine; e-mail: chesnokova_marin@mail.ru

Information about authors:

Chesnokova M.G., <http://orcid.org/0000-0001-9055-977X>;

Chesnokov V. A., <http://orcid.org/0000-0003-4100-9354>;

Mironov A. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4148-0752>;

Blesman A. I., <https://orcid.org/0000-0003-2837-3469>;

Polonyankin D. A., <https://orcid.org/0000-0001-6799-3105>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 20.01.2022

Accepted 20.04.2022

Published 18.07.2022

Потребность в использовании современных методов описания пространственной организации микробных сообществ является актуальной, поскольку изучена недостаточно [1–3]. Новые методы получения информации о морфологических особенностях отдельных клеток микроорганизмов и сообщества микробиома в целом, при колонизации определённой экологической ниши в организме человека представляют значительный интерес для исследователей [4, 5]. Метод модуляционной интерференционной микроскопии приобретает особенное значение, имеющее в дальнейшем различные варианты практического применения в медицине и биотехнологии. Лазерный измерительно-информационный комплекс МИМ-340, разработанный с применением технологии модуляционной интерференционной микроскопии позволяет получить количественную информацию о пространственно-временных флуктуациях мембранного потенциала, проводит измерение геометрических параметров трёхмерного микрорельефа поверхности [6]. Модуляционная интерференционная микроскопия основана на измерении локальных фаз модулированной объектом световой волны при контроле поляризации излучения. Высокое качество пространственного разрешения достигают при учёте фаз и контроле поляризации. Используемый метод временных интервалов представляет собой новый алгоритм вычисления фазы отражённого от объекта волнового фронта и является сочетанием быстрого действия шаговых методов и сверхразрешения фазометрических методов [7]. Биоплёнка представляет собой микробное сообщество, состоящее из клеток, прикрепленных между собой и к поверхности и заключенных в матрикс экстрацеллюлярных полимерных соединений. Матрикс биоплёнки, образуемый бактериями микробиома в биоплёнке, является её основным структурным компонентом и состоит из продуктов жизнедеятельности клеток микроорганизмов и компонентов питательной среды, выполняет роль защитного

барьера от воздействия иммуноглобулинов и антимикробных препаратов (АМП) [8, 9].

Для грибов рода *Candida* характерна высокая изменчивость в результате воздействия факторов внешней среды, детерминированная антигенами. При смене фаз роста наблюдаются изменения структуры клеточной стенки, обуславливающие лабильность антигенной структуры [10, 11]. Полость рта является благоприятной экологической нишей для колонизации грибами и последующей возможной их инвазии в эпителий слизистой оболочки. Влияние грибов *C. albicans* на базисные пластмассы съёмных протезов недостаточно освещено и изучено [12, 13].

После адгезии с участием ряда адгезинов гриба (поверхностные белки, «интегриноподобные» протеины, поверхностные гликопротеиды, полисахариды, фимбрии-маннопротеинов, углеводные части маннопротеинов клеточной стенки) и микотической колонизации абиотической поверхности происходит дальнейшее развитие биодеградации акриловых пластмасс.

Установлено, что бактерии рода *Lactobacillus* конкурируют с грибами рода *Candida* за пищевые субстраты и рецепторы адгезии и выделяют при этом фунгицидные факторы, межвидовые взаимодействия грибов рода *Candida* с отдельными микроорганизмами способствуют активной адгезии к эпителию и колонизации полости рта грибами. При инвазии в ткани клетки *Candida albicans* трансформируются в тканевую форму при этом процесс сопровождается характерным уменьшением толщины клеточной стенки. Находясь в биоплёнке *C. albicans* являются наиболее защищёнными от действия АМП [14, 15]. Наличие грибов рода *Candida* в составе биоплёнки поддесневой зубной бляшки обуславливает рецидивный, затяжной, устойчивый к проведению традиционной терапии характер течения воспалительного процесса [16, 17, 19].

Принимая во внимание, что съёмные ортопедические конструкции в полости рта являются потенциаль-

ным местом адгезии и колонизации микроорганизмов, в предыдущих исследованиях ранее мы проводили исследование биоплёнок *C. albicans* на поверхности базисных пластмасс съёмных ортопедических конструкций с применением сканирующей электронной микроскопии [18].

Для нас представляло несомненный интерес изучение особенностей формирования биоплёнки грибами *C. albicans* на поверхности базисных пластмасс горячего типа полимеризации при применении метода лазерной модуляционной интерференционной микроскопии.

Цель исследования: провести анализ микрорельефа биоплёнки грибов *C. albicans* базисных пластмасс горячего типа полимеризации при применении метода лазерной модуляционной интерференционной микроскопии.

Материал и методы. Изучение биоплёнок грибов рода *Candida* на образцах базисных пластмасс проводили на базе нанотехнологического центра ФГБОУ «Омский государственный технический университет».

Клинические штаммы *C. albicans* предварительно выделены со слизистой оболочки полости рта пациентов при ортопедической реабилитации и идентифицированы до вида. Для идентификации использованы селективные хромогенные среды «CandiSelect 4» (Bio-Rad) и коммерческие тест-системы, основанные на исследовании ауксаногаммы: «Auxacolor 2» (Bio-Rad), осуществлён тест формирования ростковых трубок, способность к образованию хламидоспор.

Оценивали характер выраженности гемагглютинирующей активности клинических штаммов *C. albicans*, выделенных со слизистой оболочки полости рта пациентов на этапах ортопедической реабилитации по отношению к эритроцитам человека I (0) и II (A) групп крови и морской свинки. Установлен характер гемагглютинирующей способности, проявляющейся в маннозрезистентности или маннозочувствительности культуры в реакции бактериальной гемагглютинации. При проведении исследований выбран клинический штамм, обладающий выраженной гемагглютинирующей активностью

с проявлением маннозрезистентной гемагглютинации с эритроцитами человека I (0) группы крови и морской свинки.

Определена топография поверхности 27 образцов пластмасс. При исследовании образцов базисных пластмасс методом лазерной интерференционной микроскопии получены 53 микрофотографии биоплёнки поверхности. В соответствии с дизайном исследования культуру грибов *C. albicans* и кусочки образцов пластмасс горячего типа полимеризации (полиметилметакрилата) «Фторакс» ТУ 64-2-120-82 (АО Стома, Украина) культивировали в питательной среде (инкубация 45 сут), фиксировали по методу Ito-Karnovsky. Исследование поверхности образцов пластмасс методом лазерной интерференционной микроскопии осуществлено с применением лазерного интерференционного микроскопа МИМ-340 (Швабе, Госкорпорации «Ростех», Россия). На поверхности опытных образцов выбирали участки с массивным слоем образования биоплёнки. Обработку топографии интерферограмм поверхности образцов проводили в программах MIM Soft-3 и MIM Visualizer (фильтрация, статистическая обработка, 2D, 3D визуализация).

Результаты. При исследовании поверхности образцов пластмасс методом лазерной интерференционной микроскопии получено изображение биоплёнки грибов *C. albicans* на поверхности пластмассы горячего типа полимеризации в 3 D и 2 D вариантах визуализации фазового портрета.

Описана горизонтальная и вертикальная структура биоплёнок, определены количественные характеристики рассматриваемого био профиля. В вертикальной плоскости фазовая высота скоплений клеток достигала 150 нм. 3D профиль биоплёнки площадью 6,1x6,1 мкм представлен на рис. 1.

На фазовом изображении определено неоднородное строение биоплёнки, обусловленное различной плотностью и скоплением клеток по площади поверхности.

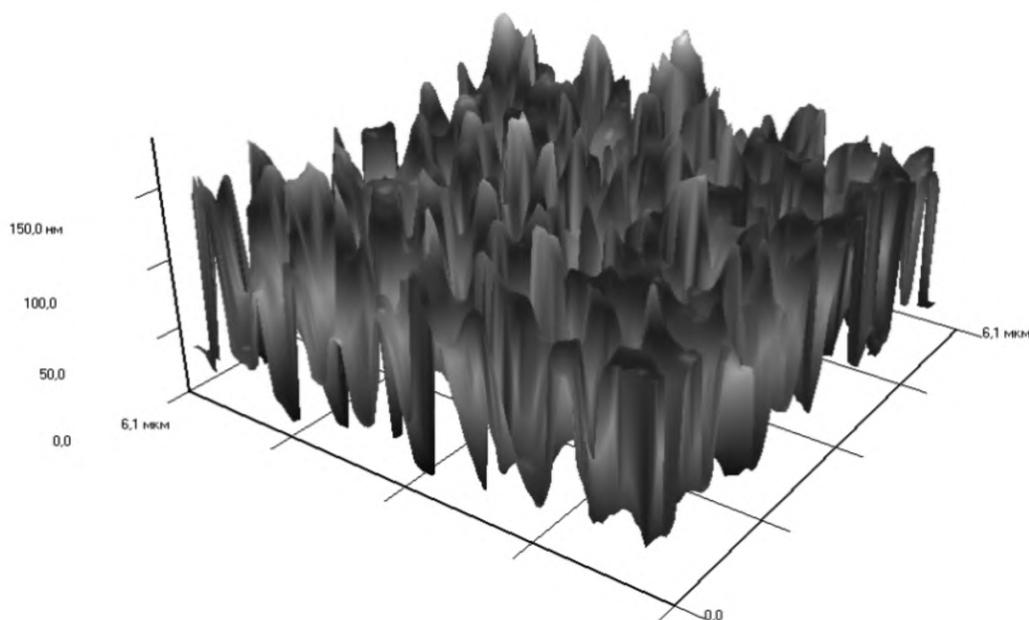


Рис. 1. Биоплёнка грибов *C. albicans* на поверхности пластмассы горячего типа полимеризации, 3 D визуализация фазового портрета.

С качественной точки зрения можно сделать вывод о том, что поверхность развитая, с высокой эффективной площадью, отмечается много впадин и выступов высотой порядка 150 нм. На 2D профиле показаны линии, вдоль которых определялась шероховатость поверхности (для статистики выбирали 7 линий) (рис. 2).

Анализ топографических особенностей отдельных участков биоплёнки грибов *C. albicans* на образце пластмассы горячего типа полимеризации установил особенности по линиям сечений. На рис. 3 показан профиль сечения линии 1-го фазового портрета биоплёнки грибов *C. albicans*.

С целью изучения характеристики поверхности определяли её особенности в соответствии с критериями шероховатости. Шероховатость биоплёнки определяет её важнейшие свойства – внешний вид, плотность, устойчивость к воздействию различных соединений. Шероховатость поверхности биоплёнки представляет совокупность неровностей поверхности с относительно малыми шагами на базовой длине.

Определены параметры шероховатости биоплёнки грибов *C. albicans* на поверхности пластмассы горячего типа полимеризации: L – базовая длина, m – средняя линия профиля, Smi – средний шаг неровностей профиля, Si – средний шаг местных выступов профиля, $Hi\ max$ – отклонение пяти наибольших максимумов профиля, $Hi\ min$ – отклонение пяти наибольших минимумов профиля, $hi\ max$ – расстояние от высших точек пяти наибольших максимумов до линии, параллельной средней и не пересекающей профиль, $hi\ min$ – расстояние от низших точек пяти наибольших минимумов до линии, параллельной средней и не пересекающей профиль, $Rmax$ – наибольшая высота профиля, yi – отклонения профиля от средней линии профиля, p – уровень

сечения профиля, bn – длина отрезков, отсекаемых на уровне сечения профиля.

К высотным параметрам шероховатости биоплёнки относили Ra – среднее арифметическое из абсолютных значений отклонений профиля в пределах базовой длины, Rz – сумму средних абсолютных значений высот пяти наибольших выступов профиля и глубин пяти наибольших впадин профиля в пределах базовой длины, $Rmax$ – наибольшую высоту профиля.

При учёте шаговых параметров устанавливали Sm – средний шаг неровностей, S – средний шаг местных выступов профиля, tp – относительную опорную длину профиля.

Изучение шаговых параметров по базовой линии позволило установить Smi средний шаг неровностей профиля, соответствующий 1300 нм на участке биоплёнки. При анализе данного показателя крупных сегментов, включающих несколько структурных составляющих единиц, значение этого показателя возрастало и составило 4100 нм.

Определение среднего шага местных выступов профиля позволило установить средний показатель на исследуемом участке 1430 нм. При анализе данного показателя крупных сегментов, включающих несколько структурных составляющих единиц, значение этого показателя возрастало и составило 4300 нм.

При анализе данного показателя крупных сегментов, включающих несколько структурных составляющих единиц, значение этого показателя возрастало и соответствовало 1,6 мкм, $dX=6,078$ мкм, $dY=81,900$ нм.

Определены высотные параметры: показатель Ra составил 41,683 нм, $Rmax$ – 150 нм, $hi\ min$ – 25,0 нм, $hi\ max$ – 56 нм. При определении показателя yi – отклонения профиля от средней линии профиля установлено среднее значение 43,75 нм. На рассмотренном участке

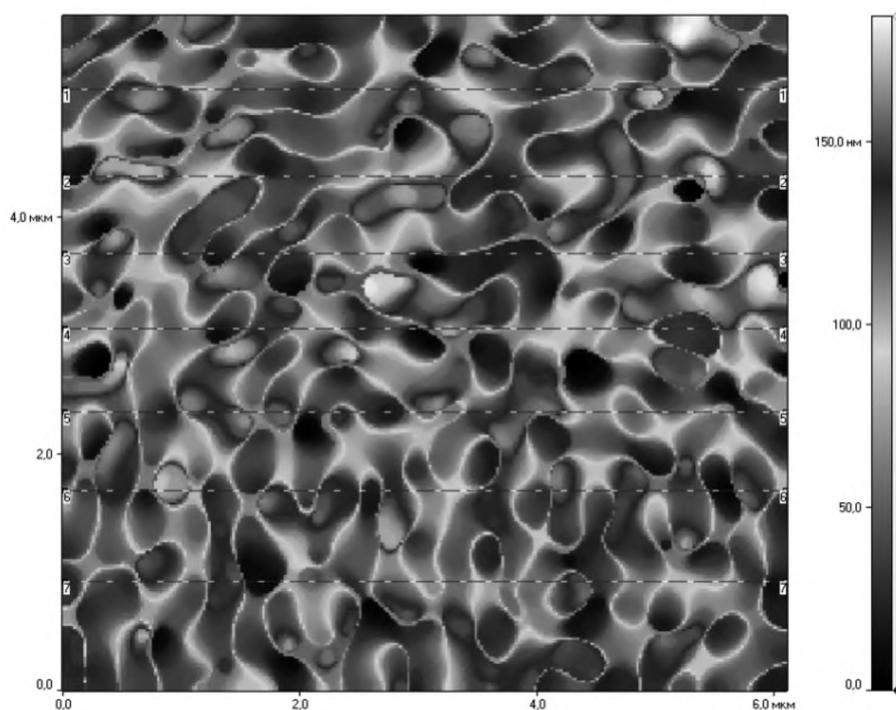


Рис. 2. Биоплёнка грибов *C. albicans* на образце пластмассы горячего типа полимеризации, фазовый портрет биоплёнки, 2D профиль.

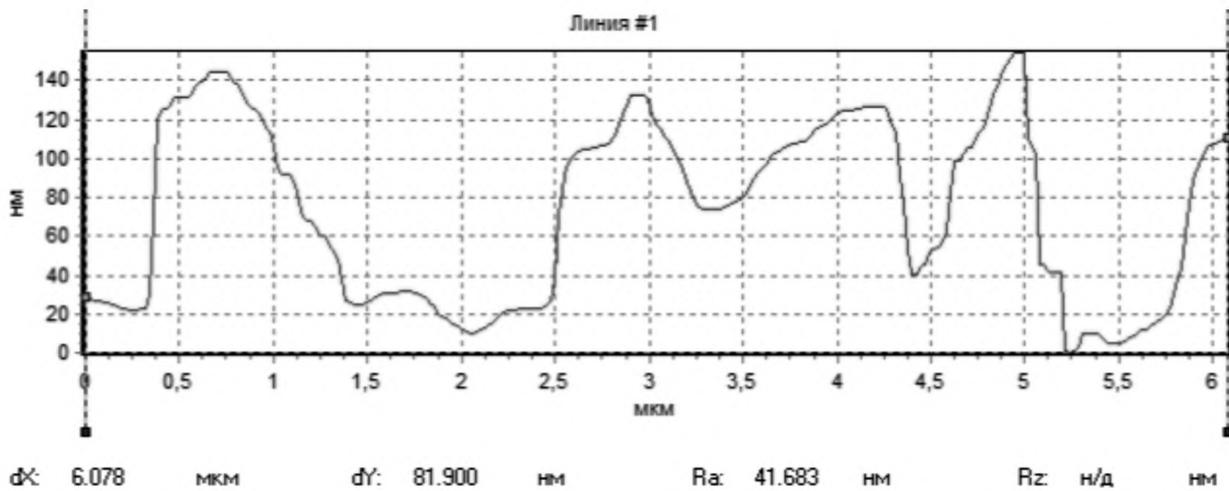


Рис. 3. Профиль сечения линии 1-го фазового портрета биоплёнки грибов *C. albicans*.

Здесь и на рис. 4: по оси абсцисс – показатели высотных параметров – dX в микрометрах (в мкм), dY, Ra и Rz в нанометрах (нм), по оси ординат – уровень высотных параметров профиля сечения в нанометрах (в нм).

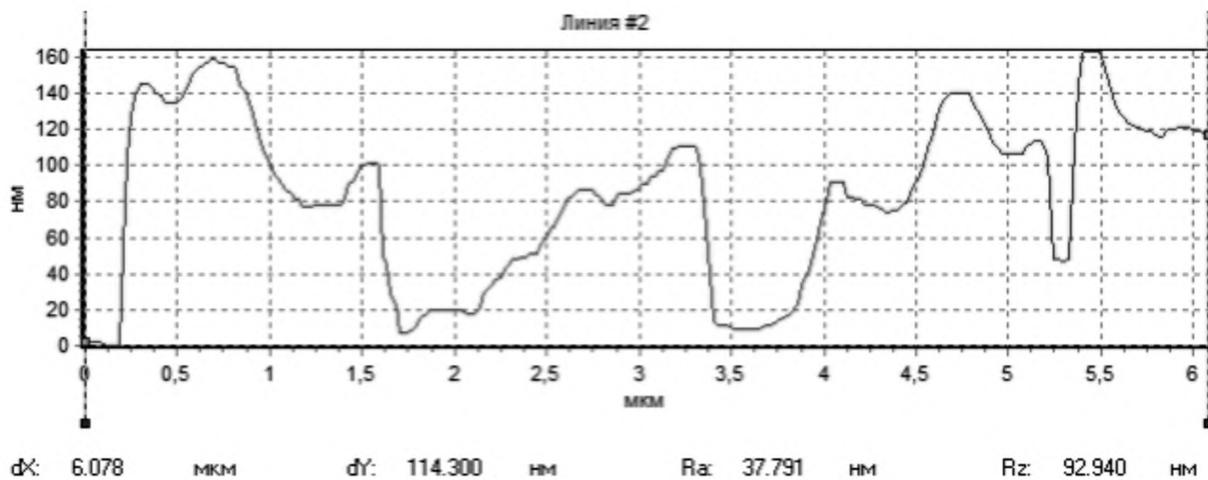


Рис. 4. Профиль сечения линии 2-го фазового портрета биоплёнки грибов *C. albicans*.

bn длина отрезков, отсекаемых на уровне сечения профиля, равнялась 0,52 мкм.

Профиль сечения линии 2-го фазового портрета биоплёнки грибов *C. albicans* показан на рис. 4.

Изучение шаговых параметров по базовой линии позволило установить, что показатель Средний шаг неровностей профиля соответствует 750 нм, при этом доля неровностей профиля со значением 500 нм и менее составила 42,9% случаев на участке биоплёнки. При анализе данного показателя крупных сегментов, включающих несколько структурных составляющих единиц, значение этого показателя возрастало и составило 1,93 мкм. Средний шаг местных выступов профиля установлен на исследуемом участке 700 нм, при этом 62,5% местных выступов профиля наблюдалось со значением 600 и менее нм на участке биоплёнки.

При анализе данного показателя крупных сегментов, включающих несколько структурных составляющих единиц, значение этого показателя возрастало и соответствовало 1,6 мкм, показатель dX=6,078 мкм, dY=114,300 нм.

Определение высотных параметров показало среднее арифметическое из абсолютных значений отклонений профиля в пределах базовой длины 37,791 нм, а Rz – соответствовал 92,940 нм. *Rmax* – наибольшая высота профиля соответствовала 160 нм. Расстояние от низших точек пяти наибольших минимумов до линии, параллельной средней и не пересекающей профиль, составило 22,5 нм при среднем значении расстояний от низших точек общего количества минимумов до линии, параллельной средней и не пересекающей профиль 39,2 нм. Определен *hi max* при значении, составившем 64 нм, при среднем значении расстояний от высших точек общего количества максимумов до линии, параллельной средней и не пересекающей профиль 43,0 нм.

При определении показателя *yi* – отклонения профиля от средней линии *m*; установлено среднее значение 55,0 нм, при этом 83,3% отклонений от профиля биоплёнки имели среднее значение от 50 нм и более.

На рассмотренном участке *bn* – длина отрезков, отсекаемых на уровне сечения профиля, равнялась 0,47 мкм.

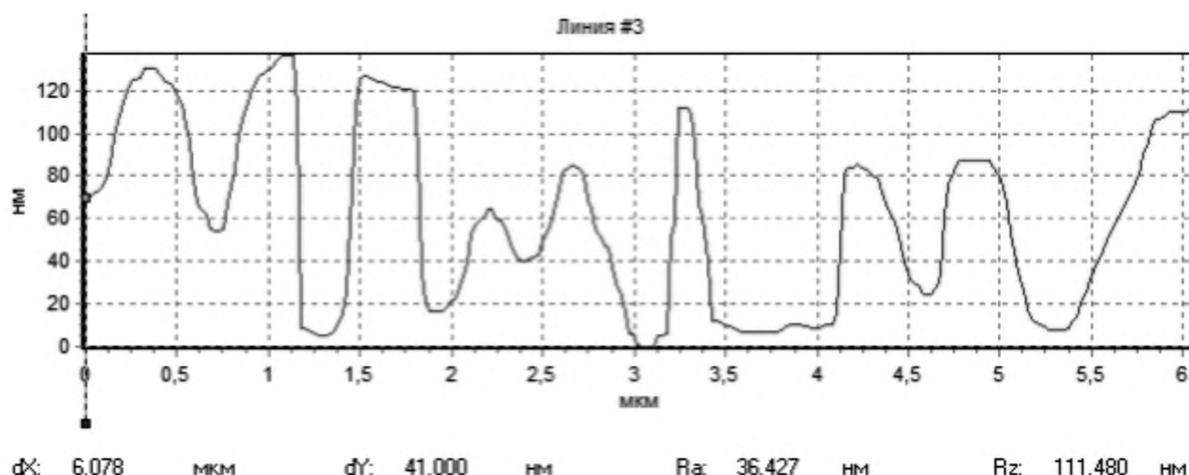


Рис. 5. Профиль сечения линии 3-го фазового портрета биоплёнки грибов *C. albicans*.

По оси абсцисс – показатели высотных параметров – dX в микрометрах (в мкм), dY , Ra и Rz в нанометрах (в нм), по оси ординат – уровень высотных параметров профиля сечения линии 3 в нанометрах (в нм).

Профиль сечения линии 3 фазового портрета биоплёнки грибов *C. albicans* представлен на рис. 5.

Изучение шаговых параметров по базовой линии установило, что показатель Smi профиля соответствовал 440 нм, при этом доля неровностей профиля со значением 600 и менее нм составила 71,43% случаев на участке биоплёнки. Средний показатель местных выступов профиля на исследуемом участке отмечался 600 нм, при этом 66,7% местных выступов профиля наблюдалось со значением 600 и менее нм на участке биоплёнки, $dX=6,078$ мкм, $dY=41,000$ нм.

Определены высотные параметры: Ra в пределах базовой длины – 36,427 нм, Rz соответствовала 111,480 нм при $Rmax$ – 140 нм.

Показатель $hi\ min$ составил 11 нм при среднем значении расстояний от низших точек общего количества минимумов до линии, параллельной средней и не пересекающей профиль 21,9 нм, $hi\ max$ – 54 нм при среднем значении расстояний от высших точек общего количества максимумов до линии, параллельной средней и не пересекающей профиль 44,0 нм. При определении показателя ui установлено среднее значение 48,70 нм, при этом 85,7% отклонений от профиля биоплёнки имели среднее значение менее 40 нм. На рассмотренном участке длина отрезков, отсекаемых на уровне сечения профиля равнялась 0,33 мкм.

Полученные изображения профиля сечения последующих линий фазового портрета исследуемой биоплёнки грибов *C. albicans* аналогично характеризовались определёнными параметрами.

Обсуждение. Исследование поверхности образцов пластмасс с помощью лазерной интерференционной микроскопии позволило получить изображения биоплёнки грибов *C. albicans* на поверхности пластмассы горячего типа полимеризации (полиметилметакрилата) «Фторакс» в 3D и 2D вариантах визуализации фазового портрета, характеризующейся развитой поверхностью с наличием большого количества впадин и выступов. При изучении горизонтальной и вертикальной структуры биоплёнок определены количественные характеристики рассматриваемого био профиля. На фазовом изображении опреде-

лено неоднородное строение биоплёнки, обусловленное различной плотностью и скоплением клеток по площади поверхности. Профиль сечения рассматриваемых линий фазового портрета биоплёнки грибов *C. albicans* на поверхности пластмассы горячего типа полимеризации характеризуется специфическими параметрами шероховатости.

Применение лазерной интерференционной микроскопии позволяет получить изображения биоплёнки грибов *C. albicans* на поверхности пластмассы горячего типа полимеризации «Фторакс» в 3D и 2D вариантах визуализации и оценить морфологические особенности биоплёнки. Изученные параметры микрорельефа на отдельной, произвольно выбранной линии фазового портрета биоплёнки позволяют определить характеристику её в необходимом конкретном участке и дают возможность проведения персонализированной оценки клеточного ряда с визуализацией и определения характеристики компонентов биоплёнки в необходимом участке её формирования в определённой биологической нише полости рта.

Заключение. Метод модуляционной интерференционной лазерной микроскопии позволяет получить информацию о морфологических особенностях клеток микроорганизмов и сообщества микробиома в целом, при колонизации определённой экологической ниши в организме человека.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-5 см. REFERENCES)

- Игнатъев П.С., Индукаев К.В., Осипов П.А., Сергеев И.К. Лазерная интерференционная микроскопия для нанобиотехнологий. *Медицинская техника*. 2013;1(277): 27-30.
- Нефедова И.Ф., Россинская В.В. Применение метода интерференционной микроскопии для изучения структурных характеристик дермальных фибробластов в культуре. *Альманах клинической медицины*. 2018; 46(8):778-83.
- Тец В.В., Тец Г.В. Микробные биоплёнки и проблемы антибиотикотерапии. *Практическая пульмонология*. 2013; 4: 60-4.
- Автандилов Г.А. Ультроструктурное исследование процесса взаимодействия *Staphylococcus aureus* с полиуретаном. *Dental forum*. 2011;3: 11-2.
- Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биоплёнки пародонта при воспалительных заболева-

- ниях дёсен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60 (12): 59-64.
11. Борисова М.И., Лазакович Д.Н., Сидорова Н.А., Савушкин А.И. Биоплёнкообразующая активность и феномен персистенции микроорганизмов. *Journal of biomedical technologies*. 2015; 2: 28-35.
12. Арутюнов А.С., Царёв В.Н., Кравцов Д.В., Комов Е.В. Сравнительный анализ адгезии микробной флоры рта к базисным материалам челюстных протезов на основе полиуретана и акриловых пластмасс. *Российский стоматологический журнал*. 2011; 1: 19-23.
13. Саливончик М.С., Каливрадзьян Э.С., Рыжова И.П. Результаты микроскопии базисных полимеров. *Современная ортопедическая стоматология*. 2014; 22: 66-7.
14. Сафаров А.М., Гурбанова С.Ф. Микробиологические особенности протезных стоматитов у лиц, пользующихся съёмными протезами на основе «Фторакса» и «литьевого термопласта медицинской чистоты». *Проблемы медицинской микологии*. 2010; 12(4): 31-4.
15. Чесноков В.А., Чеснокова М.Г. Микробиота слизистой оболочки полости рта и поверхности съёмных акриловых пластиночных протезов при ортопедической реабилитации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(2): 126-8.
16. Чесноков В.А., Чеснокова М.Г., Нестерова К.И., Мусиенко А.И. Оценка гигиенического состояния полости рта у лиц с превышением индекса массы тела на этапах ортопедической реабилитации съёмными протезами. *Пародонтология*. 2019; 24 (3): 269-273.
17. Чепуркова О.А., Чеснокова М.Г., Недосеко В.Б., Миронов А.Ю. Кандидо-ассоциированный пародонтит. Диагностика, лечение. Омск: изд-во «Вариант-Омск»; 2012.
18. Чеснокова М.Г. Чесноков В.А., Миронов А.Ю. Применение сканирующей электронной микроскопии с целью изучения биоплёнок *Candida albicans* на поверхности базисных пластмасс съёмных ортопедических конструкций. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(5): 308-13.
19. Харсеева Г.Г., Фролова Я.Н., Миронов А.Ю. Биоплёнки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(4): 346-54.
5. Creath K., Goldstein G. Dynamic quantitative phase imaging for biological objects using a pixelated phase mask. *Biomedical optics express*. 2012; 3(11): 2866-80.
6. Ignat'yev P. S., Indukayev K. V., Osipov P. A., Sergeev I. K. Laser interference microscopy for nanobiotechnology. *Meditsinskaya tekhnika*. 2013; 1(277): 27-30. (in Russian)
7. Nefedova I.F., Rossinskaya V.V. Application of the method of interference microscopy to study the structural characteristics of dermal fibroblasts in culture. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2018; 46(8): 778-83. (in Russian)
8. Tets V.V., Tets G.V. Microbial biofilms and antibiotic problems. *Prakticheskaya pul'monologiya*. 2013; 4: 60-4. (in Russian)
9. Avtandilov G. A. Ultrastructural study of the interaction process of *Staphylococcus aureus* with polyurethane. *Dental forum*. 2011; 3: 11-2. (in Russian)
10. Ippolitov E.V., Didenko L.V., Tsarev V.N., Avtandilov G.A. Features of the morphology of periodontal biofilm in inflammatory diseases of the gums (chronic catarrhal gingivitis, Chronic periodontitis, candida-associated periodontitis) according to electron microscopy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60 (12): 59-64. (in Russian)
11. Borisova M.I., Lazakovich D.N., Sidorova N.A., Savushkin A.I. Biofilm-forming activity and the phenomenon of persistence of microorganisms. *Journal of biomedical technologies*. 2015; 2: 28-35. (in Russian)
12. Arutyunov S.D., Tsarev V.N., Ippolitov E.V., Apresyan S.V. Biofilm formation on temporary dentures: the ratio of the processes of primary microbial adhesion, coaggregation and colonization. *Stomatologiya*. 2012; 91: 5-10. (in Russian)
13. Salivonchik M.S., Kalivradzhiyan E.S., Ryzhova I.P. The results of the microscopy of basic polymers. *Sovremennaya ortopedicheskaya stomatologiya*. 2014; 22: 66-7. (in Russian)
14. Safarov A.M. Microbial contamination of the oral cavity when wearing removable dentures based on various materials. *Sovremennaya stomatologiya*. 2010; 2: 103-5. (in Russian)
15. Chesnokov V.A., Chesnokova M.G. Mycobiota of the oral mucosa and the surface of removable acrylic laminar prostheses for orthopedic rehabilitation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61(2): 126-8. (in Russian)
16. Chesnokov V.A., Chesnokova M.G., Nesterova K.I., Musienko A.I. Оценка гигиенического состояния полости рта у лиц с превышением индекса массы тела на этапах ортопедической реабилитации съёмными протезами. *Parodontologiya*. 2019; 24 (3): 269-273. (in Russian)
17. Chepurkova O.A., Chesnokova M.G., Nedoseko V.B., Mironov A.Yu. Candida associated parodontitis. Diagnostics. Treatment. Омск: Variant-Omsk; 2012. (in Russian)
18. Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A.Yu. Application of scanning electron microscopy to study the biofilms of *Candida albicans* on the surface of base plastics of removable orthopedic structures. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64(5): 308-13. (in Russian)
19. Kharseeva G.G., Frolova Ya.N., Mironov A.Yu. Biofilms of pathogenic bacteria: biological properties and role in the chronicity of the infectious process. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(4): 346-54. (in Russian)

REFERENCES

1. Kitagawa K. Thin-film thickness profile measurement by three-wavelength interference color analysis. *Applied Optics*. 2013; 52 (10): 1998-2007.
2. Shaked N. Whole-cell-analysis of live cardiomyocytes using wide-field interferometric phase microscopy. *Biomedical optics express*. 2010; 1(2): 706-19.
3. Bhaduri B., Pham H., Mir M., Popescu G. Diffraction phase microscopy with white light. *Optics Letters*. 2012; 37(6): 1094-6.
4. Xiao Yu., Hong J., Liu C., Kim M.K. Review of digital holographic microscopy for threedimensional profiling and tracking. *Optical engineering*. 2014; 53(11): 112306.

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Матосова Е.В.^{1,2}, Андрюков Б.Г.^{1,2}, Бынина М.П.², Дробот Е.И.², Ляпун И.Н.^{1,2}

БИОБЕЗОПАСНОСТЬ ПЕРСОНАЛА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ В КОНТЕКСТЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ЗАКОНА РФ № 492-ФЗ ОТ 30.12.2020 Г. «О БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»

¹Дальневосточный филиал ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» ГВМУ Министерство обороны Российской Федерации, 690013, Владивосток, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора, 690087, Владивосток, Россия

Одним из наиболее важных требований, предъявляемых к персоналу микробиологических лабораторий, работающему с патогенными инфекционными агентами, является соблюдение мер предосторожности и выполнение комплекса предохранительных мероприятий, в совокупности трактуемых как биологическая безопасность (биобезопасность). Проблемы биобезопасности актуальны и для всех клинических лабораторий, работающих с биосубстратами, с потенциальной угрозой содержания в них возбудителей гемоконтактных инфекций. Президентом Российской Федерации 30.12.2020 г. подписан Федеральный закон № 492 «О биологической безопасности Российской Федерации» (№ 492-ФЗ), регламентирующий основные правовые нормы и регулирование вопросов обеспечения биобезопасности, перечень мер по предотвращению рисков распространения инфекций вследствие аварий, биотеррористических актов и диверсий. Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 продемонстрировала, с одной стороны, эпидемиологическую уязвимость единого мирового пространства, а с другой – определяющее влияние чрезвычайных ситуаций биологического характера на возникновение негативных политических и экономических процессов в мировом сообществе. Вопросы обеспечения биобезопасности в работе микробиологических лабораторий в контексте защиты персонала и окружающей среды от случайного или непреднамеренного распространения возбудителей инфекций являются актуальными. Работа с патогенными биологическими агентами в микробиологических лабораториях постоянно ассоциирована с риском возникновения аварий и возможного лабораторного инфицирования (laboratory-acquired infections) сотрудников, загрязнением окружающей среды при невыполнении требований нормативных документов по биобезопасности. В соответствии с требованиями закона № 492-ФЗ с целью предотвращения биологических угроз необходимо создание в микробиологических лабораториях системы мониторинга биологических рисков при работе с любым инфицированным материалом.

Ключевые слова: микробиологические лаборатории; биологическая безопасность; Федеральный закон № 492-ФЗ от 30.12.2020 г.; патогенные биологические агенты; опасный биологический объект; персонал лабораторий; аварии; профессиональное инфицирование; лабораторные инфекции.

Для цитирования: Матосова Е.В., Андрюков Б.Г., Бынина М.П., Дробот Е.И., Ляпун И.Н. Биобезопасность персонала микробиологических лабораторий в контексте Федерального закона РФ № 492-ФЗ 30.12.2020 г. «О биологической безопасности Российской Федерации». *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (7): 414-422. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-414-422>

Для корреспонденции: Андрюков Борис Георгиевич, д-р мед. наук, нач. ИНИИО ДФ ГНИИИ ВМ МО РФ; e-mail: andrukov_bg@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 22.04.2022

Принята к печати 26.04.2022

Опубликовано 18.07.2022

Matosova E.V.^{1,2}, Andryukov B.G.^{1,2}, Bynina M.P.², Drobot E.I.², Lyapun I.N.^{1,2}

BIOSAFETY OF PERSONNEL OF MICROBIOLOGICAL LABORATORIES IN THE CONTEXT OF THE FEDERAL LAW OF THE RUSSIAN FEDERATION № 492-FZ OF DECEMBER 30, 2020 «ON THE BIOLOGICAL SAFETY OF THE RUSSIAN FEDERATION»

¹The Far Eastern Branch of the Federal State Budgetary Institution «State Research Institute of Military Medicine», 690013, Vladivostok, Russia;

²Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor, 690087, Vladivostok, Russia

One of the most important requirements for the personnel of microbiological laboratories working with pathogenic and infectious agents is the observance of precautionary measures and the implementation of a set of preventive measures, collectively interpreted as biological safety (biosafety). To a large extent, biosafety problems are also relevant for all clinical laboratories working with biosubstrates, with the potential threat of containing pathogens of bloodborne infections in them. On December 30, 2020, the President of the Russian Federation signed Federal Law № 492 «On the Biological Safety of the Russian Federation» (№ 492-FZ), which regulates the basic legal norms and regulation of biosafety issues, as well as a list of measures to prevent the risks of the spread of infections due to accidents, bioterrorist acts and sabotage. The current pandemic of the coronavirus infection COVID-19 has demonstrated, on the one hand, the epidemiological vulnerability of the single world space, and on the other hand, the decisive

influence of biological emergencies on the emergence of negative political and economic processes in the world community. In this regard, the issues of ensuring biosafety in the work of microbiological laboratories in the context of protecting personnel and the environment from accidental or unintentional spread of infections are relevant. Working with pathogenic biological agents in microbiological laboratories is constantly associated with the risk of accidents and possible laboratory infection (laboratory-acquired infections) of employees, environmental pollution if the requirements of regulatory documents on biological safety are not met. In accordance with the requirements of № 492-FZ, in order to prevent biological threats, it is necessary to create a system for monitoring biological risks in microbiological laboratories when working with any infected material.

Key words: *microbiological laboratories; biological safety; Federal Law № 492 dated December 30, 2020; pathogenic biological agents; dangerous biological object; laboratory personnel; laboratory accidents; occupational infection; laboratory-acquired infections.*

For citation: Matosova E.V., Andryukov B.G., Bynina M.P., Drobot E.I., Lyapun I.N. Biosafety of personnel of microbiological laboratories in the context of the Federal Law of the Russian Federation № 492-FZ of December 30, 2020 «On the biological safety of the Russian Federation». *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (7): 414-422 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-414-422>

For correspondence: *Andryukov B.G.*, Doctor of Medicine, Head of Department of the Far Eastern Branch of the Federal State Budgetary Institution «State Research Institute of Military Medicine»; e-mail: andruk_bg@mail.ru

Information about authors:

Matosova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>;
Andryukov B.G., <http://orcid.org/0000-0003-4456-808X>;
Bynina M.P., <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>;
Drobot E.I., <https://orcid.org/0000-0001-7672-1582>;
Lyapun I.N., <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 22.04.2022
Accepted 26.04.2022
Published 18.07.2022

Введение. Важным требованием, предъявляемым к персоналу микробиологических лабораторий, работающему с патогенными биологическими агентами (ПБА), является соблюдение мер предосторожности и выполнение комплекса предохранительных мероприятий, в совокупности трактующихся как биологическая безопасность (биобезопасность, ББ) [1,2]. В значительной степени проблемы биобезопасности актуальны и для всех клинических лабораторий, работающих с биосубстратами, с потенциальной угрозой содержания возбудителей гемоконтактных инфекций [2-4].

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 продемонстрировала эпидемиологическую уязвимость единого мирового пространства и определяющее влияние чрезвычайных ситуаций биологического характера на возникновение негативных политических и экономических процессов в мировом сообществе [5-7]. Доказательством тому служит печальная статистика COVID-19 в мире: заражено более 450 млн населения, погибли почти 6,1 млн человек.

Мероприятия по биобезопасности, призванные обеспечить охрану здоровья сотрудников лаборатории, включая обслуживающий персонал и защиту окружающей среды, включают использование различных первичных и вторичных барьеров, многие из которых являются продуктами современных технологий материаловедения и инженерии. Выполняя клинические или научные исследования, специалисты микробиологических лабораторий работают с опасными или потенциально опасными материалами, такими как ПБА, токсичные, канцерогенные, мутагенные или агрессивные химические вещества и реагенты. Персонал таких лабораторий входит в группу повышенного профессионального риска на рабочем месте при неосторожном обращении, аварии, несоблюдении правил биобезопасности [2, 6, 7].

В России правила обращения с ПБА имеют более чем 60-летнюю историю. Они действовали в рамках

системы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования, устанавливающей обязательные для исполнения гигиенические и противоэпидемические требования при работе, в том числе при проведении клинических и научных лабораторных исследований [4,8-10]. Система мер по ББ при работе с ПБА является большим достижением российского здравоохранения, что признают эксперты во всем мире. Международные руководства по биобезопасности при работе с ПБА разработаны в значительной степени с учётом этого опыта [9, 10].

В конце 2020 г. (по отдельным статьям и пунктам – в январе и июле 2022 г.) в РФ вступил в силу Федеральный закон № 492 «О биологической безопасности Российской Федерации» (далее – № 492-ФЗ), возводящий вопросы биобезопасности в ранг государственной политики национальной безопасности [1]. Из-за важности документа и огромной зоны регулирования, обсуждение законопроекта специалистами и экспертами различного уровня и принятие органами государственной власти заняло больше года [11, 12].

Новый ФЗ регламентирует вопросы строгого соблюдения требований по ББ при планировании, организации работ в клинических и микробиологических лабораториях, мониторинг биориска при работе с ПБА, которая требует надлежащей лабораторной практики и обеспечения безопасности персонала, населения, окружающей среды от случайного инфицирования. Эти руководящие принципы предназначены для обеспечения ответственности руководителей учреждений, надлежющего управления и регулирования программ и методов биобезопасности, реализуемых на всех уровнях организации, в том числе с целью предотвращения аварий и угроз осуществления биотеррористических актов [11, 13, 14]. Современные события, происходящие на Украине, показывают своевременность и обоснованность принятия этого закона.



Рис. 1. Ключевые факторы, обеспечивающие создание и внедрение системы менеджмента биориска в микробиологических лабораториях, вытекающие из № 492-ФЗ от 30.12.2020 г.

Цель работы – обратить внимание руководителей лечебных и научных учреждений, сотрудников микробиологических и других клинических лабораторий на существующий риск профессионального инфекционного заражения на рабочем месте и важность неукоснительного выполнения требований биобезопасности и надлежащей лабораторной практики в контексте реализации основных положений №492-ФЗ [1].

№ 492-ФЗ от 30.12.2020 г.: положения о биобезопасности лабораторий

В конце 2020 г. Президентом России подписан Федеральный закон № 492-ФЗ «О биологической безопасности Российской Федерации». В терминологической части документа даны дефиниции основных понятий, используемых в концепции биологической безопасности применительно к организации деятельности лабораторий, охране здоровья персонала и окружающей среды [1].

Широкий охват регулирования этого важнейшего документа напрямую касается организации мероприятий и принятия конкретных профилактических мер по обеспечению основных принципов ББ (ст. 3), прогнозирования, оценки, идентификации, анализа и мониторинга рисков при организации диагностических исследований в лабораториях (ст. 4, 5). № 492-ФЗ регламентирует необходимость соблюдения норм и правил по обеспечению ББ, включая наличие защитного оборудования, профессиональный отбор и обучение сотрудников (ст. 6); защиту персонала лабораторий и окружающей среды от воздействия опасных биологических факторов (ст. 9); регламентирует коллекционную деятельность лабораторий (ст. 11) [1].

Закон предусматривает планирование и реализацию мероприятий, направленных на снижение опасно-

сти (угрозы) распространения инфекционных и паразитарных болезней – создание эффективной системы менеджмента биориска (ст. 10), которые должны быть четкими, практичными и специфическими для каждого учреждения, доступными для ознакомления всеми сотрудниками, регулярно пересматриваться и обновляться. Обязательным условием обеспечения ББ является необходимость обеспечения каждым сотрудником лабораторий (микробиологом, лаборантом-исследователем, инженерно-техническим персоналом) надлежащего и осознанного выполнения руководящих принципов безопасности [1, 11, 12] (рис. 1).

Согласно международным и российским законодательным и нормативным документам факторами биологической опасности, представляющими угрозу для здоровья людей и других живых организмов, являются представители органического мира: патогенные микробы, токсины (биологического происхождения), споры, грибы, биологические субстраты.

Биологическую опасность представляют биотехнологические векторы (структуры, способные вносить чужеродный генетический материал) и переносчики возбудителей инфекционных заболеваний. По статистическим оценкам ВОЗ, ежегодно в мире более 300 тыс. человек умирают от инфекционных заболеваний, ассоциированных с профессиональными контактами, связанными с источниками биологической опасности [2, 3].

В № 492-ФЗ (ст. 8) определены источники биологических опасностей (угроз) (рис. 2).

На протяжении длительного времени со стороны отечественного здравоохранения и ВОЗ не ослабевает внимание к состоянию здоровья и проблемам охраны условий труда и оценки профессионального риска медицинских работников, чья деятельность связана с

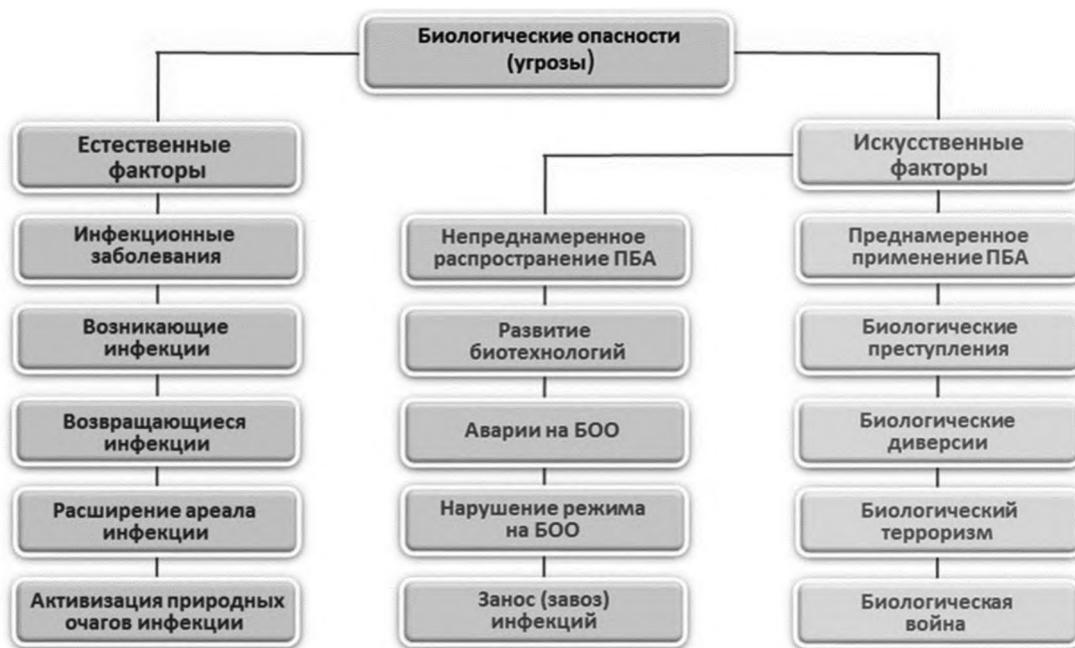


Рис. 2. Источники биологических опасностей (угроз) по № 492-ФЗ от 30.12.2020 г.

регулярными контактами с потенциально опасным инфекционным материалом с риском заражения вирусами и бактериями, в том числе, при случайной инокуляции при выполнении диагностических и научных исследований персоналом лабораторий. В бюллетене ВОЗ, опубликованном в 2018 г., указывается, что у сотрудников клинических и научных лабораторий около 40% зарегистрированных случаев вирусных и кишечных инфекций, гепатитов В и С, туберкулёза, бруцеллёза связаны с профессиональной деятельностью [9].

До подписания № 492-ФЗ в РФ принят Национальный стандарт ГОСТ Р 55234.2-2013 «Практические аспекты менеджмента риска. Менеджмент биориска». В этом стандарте впервые к оценке биологического риска при организации проведения работ в лаборатории с ПБА рекомендовано применение системного подхода, который в последующем внедрён Международной организацией по стандартизации (ISO) [15].

В 2015 г. в России принят Национальный стандарт ГОСТ Р 55234.4-2014 «Практические аспекты менеджмента риска. Требования к персоналу для снижения биориска», представляющий собой свод правил и процедур, необходимых для безопасной работы персонала с ПБА. ГОСТом установлены требования к компетенции и способностям специалистов микробиологических, клинических и научно-исследовательских лабораторий с учётом функций, выполняемых этими сотрудниками на рабочем месте, решаемых задач и мероприятиям по профилактике инфицирования в процессе проведения лабораторных исследований [16].

Принятые Национальные стандарты соответствуют международным нормативным положениям по биобезопасности лабораторий, их персонала, окружающей среды (CWA 16335:2011 «Requirements for personnel in the field of biosafety» и CWA 16335:2011 «Biosafety professional competence»). В этих документах, в частности, в концепции биобезопасности, разъяснялись

значение и содержание понятия «laboratory-acquired infections» (лабораторно приобретённые инфекции, LAI), ранее официально принятого Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ). Определено, что это инфекционные заболевания, полученные персоналом клинических или научно-исследовательских микробиологических лабораторий вследствие непосредственного выполнения своей профессиональной деятельности [3].

Лабораторно приобретённые инфекции (laboratory-acquired infections, LAI). Летопись инфицирования персонала лабораторий в процессе работы так же стара, как и сама история микробиологических лабораторий. Оценка индивидуального риска заражения, связанная с манипуляциями с ПБА, затруднена в связи с отсутствием систематической отчётности. Доступные данные ограничены ретроспективными или добровольными опросами и отдельными сообщениями о случаях вспышек инфекций среди лабораторного персонала [5, 6, 17].

Значительным событием в области ББ, первоначально именуемой термином «микробиологическая безопасность», стала публикация в журнале New Series в 1908 году статьи, описывающей новый метод подсчёта бактерий, присутствующих в воздухе, в том числе в помещениях [18]. Первые случаи заражения брюшным тифом сотрудников лаборатории после проведённых исследований датированы 1885 г. В 1915 г. сообщалось о 50 зарегистрированных случаях профессионального заражения брюшным тифом, бруцеллёзом, столбняком, холерой, дифтерией, споротрихозом в период с 1885-1904 г. г., шесть из которых закончились летальным исходом [7, 19, 20].

Трагический случай профессионального инфекционного заражения произошёл в 1910 г., когда известный ученый-исследователь Ховард Тейлор Рикеттс (Howard Taylor Ricketts), изучая возбудителя болезни, заразился сыпным тифом и умер. С того времени сообщения о случаях LAI периодически поступали из многих научных

и медицинских лабораторий мира, при том, что значительное количество заражений оказались незарегистрированными и не попали в статистику. По целому ряду причин, многие LAI были расценены как единичные артефакты, издержки проведения сложных биомедицинских исследований, однако недавние события опровергают это [19, 21].

По оценкам экспертов ВОЗ, около 1,5 млн сотрудников, работающих в микробиологических лабораториях мира, ежедневно подвергаются риску профессионального заражения и воздействия различных ПБА [2]. Неслучайно в 1947 г. в США была создана первая исследовательская лаборатория мирного времени, специально предназначенная для обеспечения микробиологической безопасности в здравоохранении и научно-исследовательских учреждениях [17]. Международное обсуждение вопросов ББ и профессиональных рисков инфицирования персонала лабораторий при исследовании отдельных ПБА оказалось в центре внимания с 80-х годов прошлого века [21–23].

Профильный комитет ВОЗ в 1985 г. опубликовал документ «Биобезопасность в лаборатории: разумные методы обращения с инфекционными материалами и их удаления» («Biosafety In The Laboratory: Prudent Practices for the Handling and Disposal of Infectious Materials») [17, 24]. Этот документ представлял собой краткий набор практических рекомендаций по обращению с биологически опасными материалами и их утилизации, а также содержал 7 основных правил по биобезопасности. Тогда же было заявлено о необходимости национальной и глобальной регистрации всех случаев LAI, которые создают риск передачи инфекции от заболевшего сотрудника лаборатории в окружающую среду [17, 24–26].

Сегодня, спустя 37 лет, контроль биобезопасности в лабораториях остается главной задачей, поскольку до настоящего времени мониторинг и оценка профессионального инфицирования сотрудников лабораторий по-прежнему отсутствует во многих учреждениях [25, 27–29]. Отчасти это связано с трудностями регистрации, ведением форм отчетности, отсутствием точной интерпретацией данных. Вместе с тем, зачастую за этими объяснениями скрывается нежелание руководства лабораторий, администрации научных или клинических учреждений признавать упущения в организации мероприятий по ББ, а то и полное отсутствие системы оценки биологических рисков при работе с ПБА [28, 30].

Известен случай, когда в 2001 г. в США сотрудник микробиологической лаборатории общественного здравоохранения заразился кожной формой сибирской язвы из-за несанкционированной замены дезинфицирующих средств [7, 31]. Аналогичный случай произошел в 2004 г. с исследователем-микробиологом из пекинской лаборатории. Ученый инфицировался коронавирусом в процессе работы с возбудителем SARS-CoV (тяжелого острого респираторного синдрома) и заразил свою мать, которая впоследствии заболела и умерла. Как показало расследование, вероятная причина была связана с некорректным проведением процедуры инактивации вируса [20, 32].

В этом же году материал, содержащий *Bacillus anthracis*, был, как ошибочно предполагалось, инактивирован в лаборатории в штате Мэриленд (США) и отправлен для дальнейших исследований на животных в Калифорнийскую микробиологическую лабораторию. Когда все исследуемые животные умерли с симптомами сибирской язвы, исследователи заподозрили, что процеду-

ра инактивации *B. anthracis* не была проведена, и в результате восемь работников лаборатории прошли профилактическое специфическое лечение [20].

Джанет Паркер (Janet Parker), по-видимому, была последней жертвой натуральной оспы, это произошло в результате утечки вируса из авторитетной исследовательской лаборатории Медицинской школы Бирмингемского университета в Великобритании. Она заразилась в конце июля, заболела 11 августа 1978 г. и умерла 11 сентября 1978 г. Как часто бывает при лабораторных приобретённых инфекциях, болезнь вовремя не была диагностирована. За это время Джанет успела заразить свою мать, а руководитель лаборатории, проф. Генри Бедсон, покончил жизнь самоубийством. Расследование показало, что вирус с воздушным потоком в виде аэрозоля распространился из лаборатории в соседнее помещение, расположенное этажом выше [33].

В 2009 г. в лаборатории Чикагского университета после проведения исследований молекулярного геноза бубонной чумы с целью выделения иммуногенных белков из устойчивого к хлорамфениколу штамма *Yersinia pestis* заразился и умер 60-летний профессор-микробиолог Малколм Касадабан (Malcolm Casadaban). Гриппоподобные симптомы и отсутствие бубона затруднили своевременное установление диагноза первично-септической формы чумы, администрация университета долгое время исключала лабораторное заражение исследователя, но, в результате, признала факт LAI, переложив всю вину за случившееся на погибшего микробиолога [30].

В 2014 г. во время ликвидации вспышки лихорадки Эбола в Сьерра-Леоне при выполнении научных и клинических исследований погибли пять сотрудников микробиологической лаборатории государственной больницы [34].

Заболеемость и характеристика LAI варьируется в зависимости от специфики учреждения и выполняемых исследований. Анализ и сравнение уровней заболеваемости, показателей статистики смертности в результате лабораторных инфекций – непростая задача. Необходимость сбора данных и максимально полного анализа имеющихся сообщений важна с точки зрения повышения биобезопасности персонала лабораторий, что перевешивает имеющиеся трудности [28, 30, 33].

Первый масштабный научный анализ 3921 случая LAI, проведённый в конце XX века, установил, что профессиональные заражения вызваны 159 видами микроорганизмов, из которых на 10 инфекционных агентов (бруцеллёз, лихорадка Ку, гепатиты, брюшной тиф, туляремия, туберкулёз и др.) пришлось более 50% случаев, с 173 летальными исходами [36, 37].

Последующее изучение причин зарегистрированных случаев LAI носило выборочный характер и проведено на основании данных, полученных из клинических и научных лабораторий Великобритании [38–40] и США (штат Юта) [31] в 1994–1995 гг. и 1978–1992 гг. соответственно. Современные исследования показали, что с начала XXI века произошло смещение спектра этиологических агентов LAI в сторону преобладания возбудителей кишечных инфекций: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇, *Brucella* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *S. aureus* [20, 29]. Риск профессионального заражения *Brucella* spp. (641 случай на 100 тыс. сотрудников микробиологических лабораторий) значительно превышает риск для населения в целом (0,08 случая на 100 тыс. человек) [20].

Эти результаты согласовываются с данными обзоров, выполненных на основании анализа 33 случаев профессиональных инфицирований сотрудников микробиологических лабораторий в Северной Америке в 2002-2004 гг. Наиболее распространёнными LAI являются шигеллёз, бруцеллёз, менингит, сальмонеллёз. Среди ПБА бактерии составляют более 43% инфекционных агентов [27, 29]. Частые случаи заражения связаны с *Brucella* spp. и *Neisseria meningitidis*. Инфицирование *N. meningitidis* имело место в клинических лабораториях США, около 50% из них заканчивались смертельным исходом [41].

Наиболее полный анализ случаев и причин LAI, зарегистрированных в странах Азиатско-Тихоокеанского региона (Австралии, Японии, Южной Кореи, Сингапуре, Китае, Малайзии, Индии, Тайване), опубликован в 2018 г. В отчёте помимо количества случаев и причин инфекций, отражена их значимость и опасность для общества, основные факторы риска, связанные с лабораторными инфекциями, последствия для окружающей среды в случае случайного или непреднамеренного распространения ПБА [42]. Авторы в поисках данных ограничились сообщениями из интернета, но результаты их анализа и выводы интересны и заслуживают внимания [42].

Среди приоритетных и наиболее опасных бактерий-возбудителей LAI, в настоящее время вызывающих наибольшую озабоченность, выделяют *Brucella* spp., *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis* (рис. 3).

Аналогичные исследования, проведённые в последние десятилетия, отражают современную тенденцию включать в статистику LAI, помимо персонала научных лабораторий университетов и институтов, сотрудников клинических (в том числе, микробиологических) лабораторий, занимающихся диагностическим исследованием и работающим с биосубстратами пациентов. В кон-

цепции правил и норм биобезопасности и обеспечения их соответствия требованиям надлежащей лабораторной практики между этими лабораториями нет чёткой границы [6, 9, 20, 33].

Надлежащая микробиологическая лабораторная практика в концепции правил и норм биобезопасности. Безопасная работа и проведение качественных исследований являются ключевыми принципами любой лаборатории. Надлежащая микробиологическая лабораторная практика (НМЛП) предназначена для защиты сотрудников лаборатории окружающей среды [2, 4, 6, 7]. Лабораторная биобезопасность достигается за счёт базового уровня лабораторных практик и конструктивных особенностей функциональной, хорошо спроектированной лаборатории, наличии защитного оборудования, средств и методов дезинфекции и стерилизации [43-45].

Принципы НМЛП представляют собой свод правил и инструкций, стандартных операционных процедур (СОП), которые следует применять ко всем видам работ с участием микроорганизмов, независимо от группы риска или уровня защиты.

Важным аспектом НМЛП, который часто упускают из виду, является необходимость обращения со всеми микроорганизмами как с патогенными (соответственно, со всеми биосубстратами, поступающими в лабораторию, как с инфицированными), требующим рутинного использования асептических методов и других надлежащих лабораторных практик. Многие условно-патогенные микроорганизмы потенциально способные вызывать оппортунистические инфекции, в процессе лабораторного культивирования могут изменить свой патогенный потенциал [44, 46-48].

НМЛП включает в себя соблюдение следующих принципов (рис. 4):

1. Должна быть составлена и доступна инструкция по биобезопасности для всего персонала лаборатории и

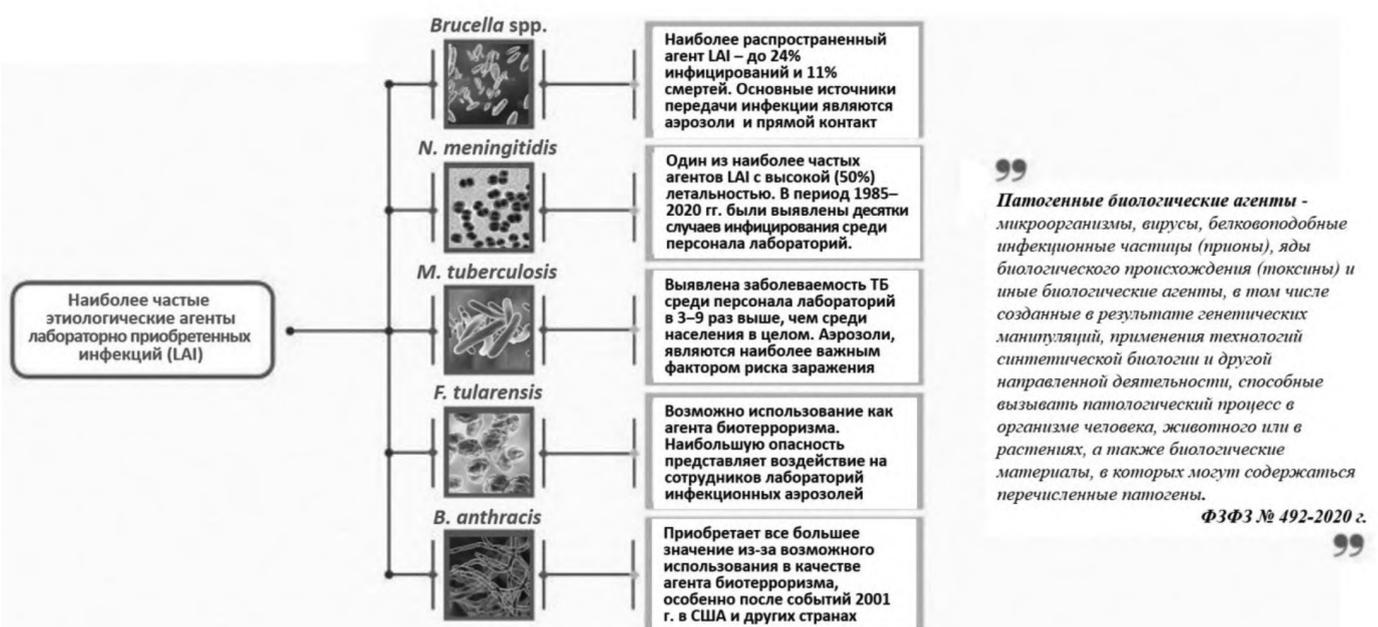


Рис. 3. Перечень приоритетных и наиболее опасных бактериальных возбудителей LAI, которые в настоящее время вызывают наибольшую озабоченность.

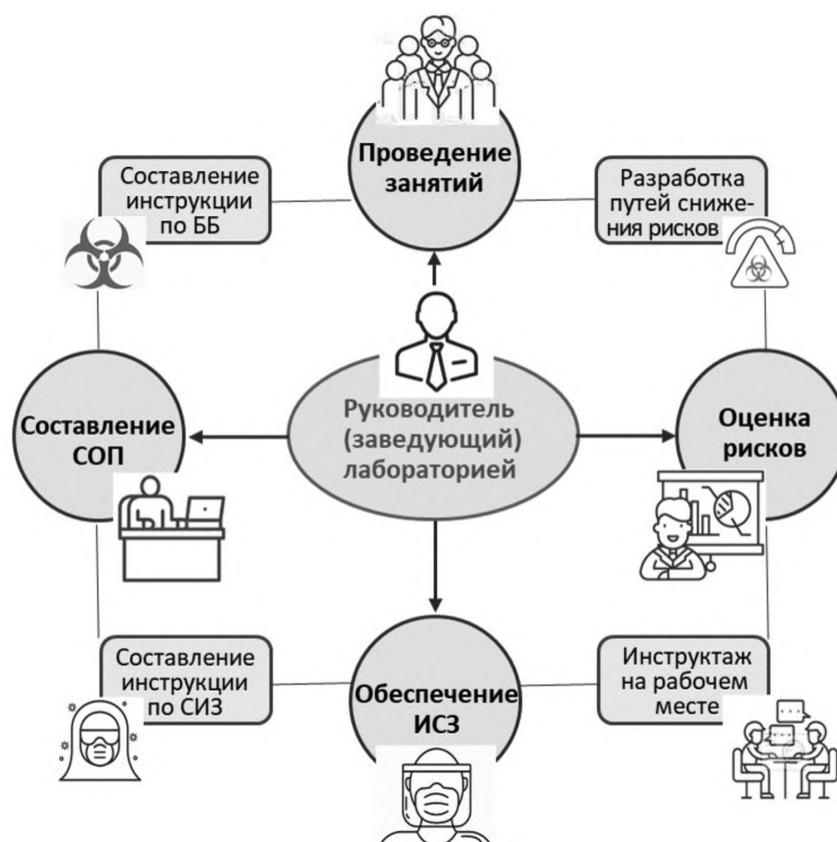


Рис. 4. Надлежащая микробиологическая лабораторная практика и функции руководителя лаборатории.

налажен регулярный контроль за соблюдением её требований; её необходимо регулярно пересматривать и обновлять. Инструкция должна включать информацию о лабораторных разливах и аварийных процедурах.

2. Перед выполнением исследований руководитель (заведующий, директор) лаборатории должен:

– составить СОП (стандартные операционные процедуры), представляющий документ, интегрирующий рабочие инструкции и содержащий информацию об алгоритме выполнения всех технологических этапов процесса, для достижения целей и решения задачи с максимальным качеством и с минимальным риском для здоровья сотрудников и окружающей среды. Ключевым отличием СОП от ранее существующих рабочих инструкций является наличие временных нормативов выполнения отдельных операций, обеспечивающих максимальную результативность и эффективность процессов;

– проинформировать сотрудников лаборатории о потенциальных опасностях (рисках), связанных с выполняемой работой, и выполнения необходимых мер предосторожности для предотвращения воздействия ПБА, потенциально содержащегося в доставленных в биосубстратах, правилах использования индивидуальных средств защиты (ИСЗ). По результатам проведённых инструктажей (инструктивно-методических занятий) сотрудники сдают зачёт (тест-контроль, экзамен), результаты которого, материалы и даты проведения занятий должны быть задокументированы и подписаны, как работником, так и руководителем.

В лаборатории запрещено есть, пить, курить, хранить продукты, личные вещи или посуду, наносить косметику;

ношение контактных линз разрешено только тогда, когда другие формы коррекции зрения невозможны.

Открытые раны, порезы, царапины и ссадины на открытых участках кожных покровов должны быть закрыты водонепроницаемыми повязками.

Пероральное пипетирование любого вещества запрещено в лаборатории.

Длинные волосы должны быть завязаны сзади или закреплены так, чтобы они не могли соприкасаться с руками, образцами, контейнерами, оборудованием.

Доступ в лабораторию и вспомогательные помещения разрешён только уполномоченному персоналу. Перечень определяет руководитель исследований или заведующий лабораторией.

Двери в лаборатории нельзя оставлять открытыми (это не относится к открытым помещениям внутри лаборатории). Снаружи на дверях должны быть запрещающие вход указатели и знаки биологической опасности.

Лаборатории должны содержаться в чистоте и порядке. Хранение материалов, не имеющих отношения к работе и не поддающихся лёгкой дезинфекции (журналов, книг, корреспонденции), должно быть сведено к минимуму, работа с документами, написание отчётов должны проводиться в помещениях лаборатории, отделённых от рабочих зон.

Весь персонал, допущенный к работе и находящийся в рабочей зоне, должен быть одет в соответствующую специальную одежду индивидуальной защиты от случайного инфицирования. Рабочая одежда общего назначения (форменная одежда, брюки, рубашки, блузки) не предназначенная для защиты от опасности, не считается

СИЗ. Перечень необходимых для использования СИЗ при проведении каждого конкретного исследования определяется заведующим лабораторией или руководителем работ путём оценки риска. Во всех помещениях лаборатории необходимо носить подходящую обувь с закрытыми носками на нескользящей подошве.

Запрещается носить защитную лабораторную одежду в нелабораторных помещениях; лабораторная одежда не должна соприкасаться с уличной одеждой.

Если произошло известное или предполагаемое воздействие, загрязнённая одежда должна быть обеззаражена перед стиркой (за исключением случаев, когда оборудование для стирки находится в изолированной лаборатории и эффективность обеззараживания доказана).

О любой нештатной ситуации, связанной с аварией на рабочем месте, случайным разбрызгиванием инфицированного материала, бульонной культуры, травмах, связанных с нарушением целостности СИЗ, кожных покровов и слизистых оболочек, должно быть немедленно доложено руководителем работ (заведующему лабораторией) [2, 4, 44, 49-52].

Контроль за соблюдением мер биобезопасности и выполнением необходимых требований администрация учреждения проводит с помощью комплекса системных мероприятий, называемым менеджментом биориска (ГОСТ Р 55234.2-2013), являющегося компетенцией специалистов по биобезопасности учреждения [15].

Заключение. Для сотрудников микробиологических и клинических лабораторий, работающих на переднем крае борьбы с инфекционными заболеваниями и чистыми культурами микроорганизмов, LAI представляет серьёзный риск. Лаборатории нуждаются в надлежащих превентивных стратегиях биобезопасности и биозащиты для защиты здоровья персонала и окружающей среды.

Вступивший в силу № 492-ФЗ укрепляет правовые основы обеспечения ББ, напрямую касающиеся деятельности лабораторий. Прописанные в ст. 6 и 7 права и обязанности граждан (персонал лабораторий) и организаций (администрации учреждений здравоохранения и науки), определённо разграничивают мероприятия по соблюдению и обеспечению мер, касающихся вопросов биобезопасности [1].

Мероприятия включают необходимость обучения и повышения осведомлённости персонала, что гарантирует надлежащее понимание и выполнение процедур биобезопасности для защиты сотрудников лаборатории и окружающей среды. Эти профилактические меры должны быть специфическими в отношении конкретных патогенов и снижать вероятность возникновения LAI. Системная стратегия, основанная на оценке рисков, должна применяться ко всем программам биобезопасности с учётом специфики факторов патогенности и способов передачи отдельных ПБА при работе с ними.

Биобезопасность стала относительно новой проблемой для гигиены труда. Её отличительным свойством являются глобальность последствий её игнорирования, включая опасность для здоровья персонала лабораторий, угрозы заражения окружающей среды и населения. Не случайно, в последние годы понятия: биобезопасность, защита населения, вакцинация, карантинные меры, стали не абстрактными, а реальными и всем понятными в связи с пандемией COVID-19. А началось всё, возможно, с нулевой жертвы – сотрудника какой-либо лаборатории.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 5–7, 17–47 см. REFERENCES)

1. Федеральный закон № 492-ФЗ от 30.12.2020 г. «О биологической безопасности в Российской Федерации». Режим доступа: <https://rg.ru/2021/01/11/bio-dok.html> (дата обращения 12.03.22).
4. Основы государственной политики, в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу (Указ Президента РФ от 11.03.2019 г. № 97). Режим доступа: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70423098> (дата обращения: 05.04.2022 г.).
8. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Топорков В.П., Смоленский В.Ю., Цербакова С.А., Кутырев В.В. Современные угрозы и вызовы в области биологической безопасности и стратегия противодействия. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 3: 5-10.
9. Андриков Б.Г., Беседнова Н.Н., А.В. Калинин и др. Биологическая и химическая безопасность. Владивосток: Дальнаука; 2019.
10. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Дёмина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В. и др. Актуальные проблемы биологической безопасности в современных условиях. Ч. 3. Научное обеспечение национального нормирования широкого формата биологической безопасности. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2014; 69 (11-12): 118-27.
11. Арчаков В., Баньковский А., Савков П. К вопросу о биологической безопасности. *Наука и инновации*. 2021; 10 (224): 30-7.
12. Арчаков В., Баньковский А., Савков П. Обеспечение биологической безопасности: зарубежный опыт в контексте современных вызовов и угроз. *Наука и инновации*. 2021; 10 (224): 21-9.
13. Делевер А.В. Обзор международного и отечественного законодательства в сфере обеспечения биологической безопасности. *Вестник Луганской академии внутренних дел имени Э.А. Дидоренко*. 2021; S1: 160-70.
14. Сизова Ю.В., Бурлакова О.С., Пичурин Н.Л. Опыт подготовки специалистов по биологической безопасности. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2021; 10 (4):115-9. DOI: 10.33029/2305-3496-2021-10-4-115-119.
15. ГОСТ Р 55234.2-2013 Национальный стандарт РФ «Практические аспекты менеджмента риска. Менеджмент биориска». М.: Консенсус; 2014.
16. ГОСТ Р 55234.4-2014 Национальный стандарт РФ «Практические аспекты менеджмента риска. Требования к персоналу для снижения биориска». М.: Консенсус; 2015.
48. Покровский В.И., Брико Н.И. Экологические и медицинские проблемы биологической безопасности. *Биозащита и биобезопасность*. 2010; 1:10-20.
49. Тюрин Е.А., Чебан Л.В. Обеспечение требований биологической безопасности при проведении биотехнологических процессов с микроорганизмами I-IV групп патогенности. *Бактериология*. 2020; 5 (4): 60-4. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-60-64.
50. СП 1.3.1285-03. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности): санитарно-эпидемиологические правила. М.: Госсанэпиднадзор России; 2003.
51. СП 1.3.2322-08. Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней: санитарно-эпидемиологические правила. М.: Роспотребнадзор. URL: <http://www.referent.ru/1/139851> (дата обращения: 10.06.14).
52. Костюкова Т.А., Гордеева М.В., Ляпин М.Н., Морозов К.М. Нормативное обеспечение биологической безопасности при работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1: 103-8. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-103-108.

REFERENCES

1. Federal Law No. 492-FZ of December 30, 2020 «On Biological Safety in the Russian Federation». <https://rg.ru/2021/01/11/bio-dok.html> (accessed 12.03. 22). (in Russian)
2. World Health Organization 4th edition: official website. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311> (accessed 14.04.2022 г.)
3. World Health Organization. 3rd ed. Geneva: Laboratory Biosafety Manual; 2004.

4. Fundamentals of state policy in the field of ensuring the chemical and biological safety of the Russian Federation for the period up to 2025 and beyond (Decree of the President of the Russian Federation № 97 of March 11, 2019). <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70423098> (accessed: 04/05/2022). (in Russian)
5. Burt C. A short history of occupational disease: 1. laboratory-acquired infections. *Ulster. Med. J.* 2021; 90 (1): 28-31.
6. Cornish N.E., Anderson N.L., Arambula D.G., Arduino M.J., Bryan A., Burton N.C. et al. Clinical Laboratory Biosafety Gaps: Lessons Learned from Past Outbreaks Reveal a Path to a Safer Future. *Clin. Microbiol. Rev.* 2021; 16; 34 (3):e0012618. DOI: 10.1128/CMR.00126-18.
7. Bayot M.L., Limaïem F. Biosafety Guidelines. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537210/>.
8. Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Toporkov V.P., Smolensky V.Yu., Shcherbakova S.A., Kutuyev V.V. Modern threats and challenges in the field of biological safety and counteraction strategy. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2015; 3: 5-10. (in Russian)
9. Andryukov B.G., Besednova N.N., A.V. Kalinin and others. Biological and chemical safety. Vladivostok: Dal'nauka; 2019. (in Russian)
10. Onishchenko G.G., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Toporkov V.P., Toporkov A.V. et al. Actual problems of biological safety in modern conditions. Part 3. Scientific support of national regulation of a wide format of biological safety. *Vestnik RAMN.* 2014; 69 (11-12): 118-27. (in Russian)
11. Archakov V., Bankovsky A., Savkov P. On the issue of biological safety. *Nauka i innovatsii.* 2021; 10 (224): 30-7. (in Russian)
12. Archakov V., Bankovsky A., Savkov P. Ensuring biological safety: foreign experience in the context of modern challenges and threats. *Nauka i innovatsii.* 2021; 10 (224): 21-9. (in Russian)
13. Delever A.V. Review of international and domestic legislation in the field of ensuring biological safety. *Vestnik Luganskoï akademii vnutrennikh del im. Didorenko.* 2021; S1:160-70. (in Russian)
14. Sizova Yu.V., Burlakova O.S., Pichurina N.L. Experience in training specialists in biological safety. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye.* 2021; 10 (4): 115-9. DOI: 10.33029/2305-3496-2021-10-4-115-119. (in Russian)
15. GOST R 55234.2-2013 National standard of the Russian Federation «Practical aspects of risk management. Biorisk management». Moscow: Consensus; 2014. (in Russian)
16. GOST R 55234.4-2014 National standard of the Russian Federation «Practical aspects of risk management. Requirements for personnel to reduce biorisk». M.: Consensus; 2015. (in Russian)
17. Whitby S., Novosiolova T., Walther G., Dando M. Preventing Biological Threats: What You Can Do. A Guide to Biological Security Issues and How to Address Them. University of Bradford, Bradford Disarmament Research Centre; 2015.
18. Winslow C.E. A new method of enumerating bacteria in air. *Science.* 1908; 28 (705): 28-31.
19. Coelho A.C., Garcia Diez J. Biological Risks and Laboratory-Acquired Infections: A Reality That Cannot be Ignored in Health Biotechnology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015; 3: 56. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00056.
20. Baron E.J., Miller J. M. Bacterial and fungal infections among diagnostic laboratory workers: evaluating the risks. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 60: 241-6. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.09.016.
21. Biological Safety: Principles and Practices / 4 Ed.: D. O. Fleming, D. L. Hunt. ASM Press Washington D.C.; 2006.
22. Collins C.H. Laboratory-acquired infections. London etc.: Butterworths; 1983.
23. Suspected Cutaneous Anthrax in a Laboratory Worker – Texas. 2002; *Applied Biosafety.* 2002; 7 (3): 173-6.
24. Sewell D.L. Laboratory associated infections and biosafety. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8: 389-405.
25. Shooter R.A. Report of the Investigation into the Cause of the 1978 Birmingham Smallpox Occurrence. London: H. M. Stationery Office; 1980.
26. Blacksell S.D., Robinson M.T., Newton P.N., Day N.P.J. Laboratory-acquired Scrub Typhus and Murine Typhus Infections: The Argument for a Risk-based Approach to Biosafety Requirements for Orientia tsutsugamushi and Rickettsia typhi Laboratory Activities. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 68 (8): 1413-9. DOI: 10.1093/cid/ciy675.
27. Weinstein R.A., Singh K., Laboratory-Acquired Infections. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49 (1): 142-7. DOI: 10.1086/599104.
28. Peng H., Bilal M., Iqbal H.M.N. Improved Biosafety and Biosecurity Measures and/or Strategies to Tackle Laboratory-Acquired Infections and Related Risks. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2018; 15 (12): 2697. DOI: 10.3390/ijerph15122697.
29. Singh K. Laboratory-acquired infections. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49 (1): 142-7. DOI: 10.1086/599104.
30. Beckwith J., Silhavy T., Schneewind O. Remembering Malcolm J. Casadaban. *J. Bacteriol.* 2010; 192 (17): 4261-3. DOI: 10.1128/JB.00484-10.
31. Jacobson J.T., Orlob R.B., Clayton J.L. Infections acquired in clinical laboratories in Utah. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 21: 486-9.
32. Wurtz N., Papa A., Hukic M., Di Caro A., Leparc-Goffart I., Leroy E. et al. Survey of laboratory-acquired infections around the world in biosafety level 3 and 4 laboratories. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2016; 35 (8): 1247-58. DOI: 10.1007/s10096-016-2657-1.
33. Silver S. Laboratory-acquired lethal infections by potential bio-weapons pathogens including Ebola in 2014. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015; 362 (1): 1-6. DOI: 10.1093/femsle/fnu008.
34. Gire S.K., Goba A., Andersen K.G., Sealfon R.S.G., Park D.J., Kanneh L., et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science.* 2014; 345: 1369-72. DOI: 10.1126/science.1259657.
35. Pentella M.A. Update on Biosafety and Emerging Infections for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin. Lab. Med.* 2020; 40 (4): 473-82. DOI: 10.1016/j.cll.2020.08.005.
36. Pike R.M. Laboratory-associated infectious: summary and analysis of 3921 cases. *Health. Lab. Sci.* 1976; 13 (12): 105-14.
37. Pike R.M., Sulkin S.E., Schulze M.L. Continuing importance of laboratory-acquired infections. *Am. J. Public Health Nations Health.* 1965; 55 (2): 190-9.
38. Grist N.R. Infections in British clinical laboratories, 1980-81. *J. Clin. Pathol.* 1983; 36 (2): 121-6.
39. Grist N.R., Emslie J. Infections in British clinical laboratories, 1982-3. *J. Clin. Pathol.* 1985; 38 (7): 721-5.
40. Grist N.R., Emslie J. Infections in British clinical laboratories, 1984-5. *J. Clin. Pathol.* 1987; 40 (8): 826-9.
41. Sejvar J.J., Johnson D., Popovic T., Miller J.M., Downes F., Somsel P., et al. Assessing the risk of laboratory-acquired meningococcal disease. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43 (9): 4811-4. DOI: 10.1128/JCM.43.9.4811-4814.2005.
42. Siengsan-Lamont J., Blacksell S.D. A Review of Laboratory-Acquired Infections in the Asia-Pacific: Understanding Risk and the Need for Improved Biosafety for Veterinary and Zoonotic Diseases. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2018; 3 (2): 36. DOI: 10.3390/tropicalmed3020036.
43. Munson E., Bowles E.J., Dern R., Beck E., Podzorski R.P., Bate-man A.C., et al. Laboratory Focus on Improving the Culture of Biosafety: Statewide Risk Assessment of Clinical Laboratories That Process Specimens for Microbiologic Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 56 (1): e01569-17. DOI: 10.1128/JCM.01569-17.
44. Chung C.L., Bellis K.S., Pullman A., O'Connor A., Shultz A. Building Biosafety Capacity in Our Nation's Laboratories. *Health Secur.* 2019; 17 (5): 353-63. DOI: 10.1089/hs.2019.0056.
45. Siengsan-Lamont J., Blacksell S.D. A Review of Laboratory-Acquired Infections in the Asia-Pacific: Understanding Risk and the Need for Improved Biosafety for Veterinary and Zoonotic Diseases. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2018; 3 (2): 36. DOI: 10.3390/tropicalmed3020036.
46. Qasmi S.A., Khan B.A. Survey of Suspected Laboratory-Acquired Infections and Biosafety Practices in Research, Clinical, and Veterinary Laboratories in Karachi, Pakistan. *Health Secur.* 2019; 17 (5): 372-83. DOI: 10.1089/hs.2019.0057.
47. Coelho A.C., Garcia Diez J. Biological Risks and Laboratory-Acquired Infections: ignore A Reality That Cannot in Health Biotechnology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015; 3: 56. DOI: 10.3389/fbioe.2015.00056.
48. Pokrovskiy V.I., Briko N.I. Ecological and medical problems of biological safety. *Biozashchita i biobezopasnost'.* 2010; 1: 10-20. (in Russian)
49. Tyurin E.A., Chekan L.V. Ensuring the requirements of biological safety when carrying out biotechnological processes with microorganisms of I-IV pathogenicity groups. *Bakteriologiya.* 2020; 5 (4): 60-4. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-4-60-64. (in Russian)
50. SP 1.3.1285-03. Safety of work with microorganisms of I-II groups of pathogenicity (danger): sanitary and epidemiological rules. Moscow: Gossanepidnadzor of Russia; 2003. (in Russian)
51. SP 1.3.2322-08. Safety of work with microorganisms of III-IV groups of pathogenicity (danger) and causative agents of parasitic diseases: sanitary and epidemiological rules. Moscow: Rospotrebnadzor of Russia; 2008. (in Russian)
52. Kostyukova T.A., Gordeeva M.V., Lyapin M.N., Morozov K.M. Normative provision of biological safety when working with microorganisms of pathogenicity groups III-IV. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2020; 1: 103-8. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-103-108. (in Russian)

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Кошечкин С.И.³, Шевченко Г.В.¹, Марданлы С.Г.^{4,5}, Дёмкин В.В.^{1,2}

ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРА Y-ХРОМОСОМЫ В ПЛАЗМЕ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ: ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ТОЧНОСТЬ НА РАЗНЫХ СРОКАХ БЕРЕМЕННОСТИ

¹ФГБУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 123182, Москва, Россия;

²ООО «НаноДиагностика», 123182, Москва, Россия;

³ООО «Кномикс», 121069, Москва, Россия;

⁴ГОУ ВО МО Государственный гуманитарно-технологический университет, 142611, г. Орехово-Зуево, Московская область, Россия;

⁵ЗАО «ЭКОлаб» 142530, г. Электрогорск, Московская область, Россия

Проведена оценка клинической информативности теста на выявление маркера Y-хромосомы в плазме беременной женщины на разных сроках беременности методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Исследованы образцы крови 4616 женщин на сроках беременности от 4 до 32 эмбриональных недель. Детекцию маркера Y-хромосомы проводили на основе амплификации участка гена TSPY. Маркер Y-хромосомы однозначно выявлен в 2131 образце, что составило 46,2% от общего числа проанализированных проб. В 233 образцах (5%) маркер Y-хромосомы выявлен с пониженной достоверностью, в 15 образцах (0,3%) при первичном исследовании однозначного заключения о наличии или отсутствии в плазме Y-специфичной ДНК сделать не удалось. Диагностическая точность определения маркера Y-хромосомы в плазме женщины на 4-6-й эмбриональной неделе беременности составляла 95,5%, с 7-й недели и на более поздних сроках беременности диагностическая точность достигала 97,3-98,2%. Тестирование с 7-й недели эмбрионального развития может рекомендоваться для надёжного пренатального определения пола плода по результатам анализа внеклеточной циркулирующей фетальной ДНК методом ПЦР-РВ.

Ключевые слова: неинвазивное пренатальное тестирование; внеклеточная циркулирующая фетальная ДНК; определение пола плода; ПЦР в реальном времени.

Для цитирования: Кошечкин С.И., Шевченко Г.В., Марданлы С.Г., Дёмкин В.В. Выявление маркера Y-хромосомы в плазме беременных женщин методом ПЦР в реальном времени: диагностическая точность на разных сроках беременности. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (7): 423-428. DOI: <https://dx.doi.org/10.15620/0869-2084-2022-67-7-423-428>

Для корреспонденции: Дёмкин Владимир Витальевич, канд.мед. наук, рук. Центра клеточных и геномных технологий; e-mail: vdemkin@img.ras.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Наборы для амплификации генов TSPY, GAPDH и BIRC5 предоставлены ООО «НаноДиагностика» на безвозмездной основе.

Поступила 22.04.2022

Принята к печати 20.05.2022

Опубликовано 18.07.2022

Koshechkin S.I.³, Shevchenko G.V.¹, Mardanyly S.G.^{4,5}, Demkin V.V.^{1,2}

DETECTION OF Y-CHROMOSOME MARKER IN PLASMA OF PREGNANT WOMEN USING REAL TIME PCR: DIAGNOSTIC ACCURACY DEPENDING ON GESTATION AGE

¹Institute of Molecular Genetics of National Research Centre «Kurchatov Institute», 123182, Moscow, Russia;

²NanoDiagnostics LLC., 123182, Moscow, Russia;

³Knomic LLC, 121069, Moscow, Russia;

⁴State educational institution of higher education of the Moscow region, State Humanitarian University of Technology «GGTU», 142611, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region, Russia;

⁵CJSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Moscow region, Russia

The evaluation of the clinical significance of the test for the detection of the Y-chromosome marker in the plasma of a pregnant woman at different stages of pregnancy by real-time PCR was carried out. The blood samples of 4616 women at 4 to 32 gestation weeks were studied. Identification of the Y-chromosome marker was carried out based on the amplification of a region of the TSPY gene. The Y-chromosome marker was unambiguously identified in 2131 samples, which accounted for 46.2% of the total number of analyzed samples. In 233 samples (5%), the Y-chromosome marker was detected with reduced reliability, and in 15 samples (0.3%), an unambiguous conclusion about the presence or absence of Y-specific DNA in plasma could not be made during the initial study. The diagnostic accuracy of the Y-chromosome marker determination in the plasma of a pregnant woman at the 4-6th gestation week was 95.5%, and from the 7th week and at later stages of pregnancy it reached 97.3-98.2%. Testing from the 7th gestation week may be recommended for reliable prenatal sex determination of the fetus by real-time PCR analysis of extracellular circulating fetal DNA.

Key words: non-invasive prenatal testing (NIPT); cell free fetal DNA (cffDNA), fetal sex determination, qPCR.

For citation: Koshechkin S.I., Shevchenko G.V., Mardany S.G., Demkin V.V. Detection of Y-chromosome marker in plasma of pregnant women using real time PCR: diagnostic accuracy depending on gestation age. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (7): (in Russ). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-7-423-428>

For correspondence: Demkin V.V., PhD, Head of the Center of Cellular and Gene Technology; e-mail: vdemkin@img.ras.ru

Information about authors:

Koshechkin S.I., <https://orcid.org/0000-0002-7389-0476>;

Shevchenko G.V., <https://orcid.org/0000-0002-1293-1078>;

Mardany S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;

Demkin V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3408-6100>.

Acknowledgment. Kits for amplification of *TSPY*, *GAPDH* and *BIRC5* genes were provided by NanoDiagnostics LLC free of charge.

Financing. The study had no sponsor support.

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

Received 22.04.2022

Accepted 20.05.2022

Published 18.07.2022

Введение. Раннее определение пола ребёнка при беременности имеет важное социальное и медицинское значение. Показания для определения пола плода связаны с риском развития заболеваний, сцепленных с полом: мышечная дистрофия Дюшенна и Беккера, гемофилия, синдром хрупкой X-хромосомы (синдром Мартина-Белла), других врождённых генетических дефектов (врождённая гиперплазия надпочечников), аномалий, связанных с неоднозначным развитием наружных половых органов в семейном анамнезе и др.

Основным методом пренатальной диагностики пола в медицинской практике является метод ультразвукового исследования (УЗИ), но он эффективен лишь во втором и третьем триместрах беременности, поскольку наружные половые органы дифференцируются только к концу первого триместра [1, 2]. В последние годы определение пола плода стало возможным в рамках проведения неинвазивного пренатального теста (НИПТ), который проводится на основе анализа материнской крови методом секвенирования и нацелен на выявление трисомий 13, 18, 21 хромосом. При проведении НИПТ с 10-й недели беременности тест обладает высокой точностью, но относительно дорог, и выполняется в течение достаточно длительного времени (от 10 до 30 дней). Альтернативой НИПТ на основе секвенирования по определению пола плода может служить метод ПЦР. Тест на наличие в крови беременной женщины Y-хромосомы методом ПЦР быстр, точен и относительно недорог.

Предпосылкой для бурного развития методов генетического неинвазивного пренатального тестирования стало открытие в 1997 г. в крови беременной женщины внеклеточной ДНК плодного происхождения [3]. Основным источником циркулирующей внеклеточной фетальной ДНК (вкфДНК) является трофобласт, который высвобождает ДНК в систему кровообращения матери в результате апоптоза [4, 5]. ВкфДНК может быть обнаружена уже на 4-5-й неделе беременности, т. е. ещё до установления собственного кровообращения плода [6, 7], и исчезает из кровотока матери уже через несколько часов после родов [8, 9]. НИПТ по фетальной ДНК в крови беременной женщины открыл возможность к выявлению анеуплоидий и других генетических дефектов плода, включая отдельные мутации [10], к раннему определению пола и резус-фактора плода [11].

Для определения пола плода методом ПЦР в качестве маркёров Y-хромосомы используются в основном два вида мишеней: однокопийный ген *SRY* и мультикопий-

ный ген *TSPY* (*DYS14*) [12, 13]. Несколько протоколов определения маркёров Y-хромосомы с использованием метода ПЦР прошли испытания и стали клинически доступны во многих странах, чему способствовали многочисленные публикации и обзоры, посвящённые анализу результативности различных методик в зарубежной научной литературе [12-14]. Оценка эффективности определения пола плода методом ПЦР-анализа вкфДНК показала, что среднестатистическая чувствительность и специфичность метода являются высокими (95,5-96% и 98,6-99%, для методик с использованием маркёров на гены *SRY* и *TSPY*, соответственно). Эти показатели в различных работах могут иметь достаточно широкий разброс: по чувствительности от 65% до 100%, по специфичности от 73% до 100% [12-14]. Неоднородность результатов может быть обусловлена как особенностями методики, применяемой каждой группой исследователей, так и, что представляется наиболее вероятным, различными сроками проведения тестирования, представленными в выборках.

Фетальная ДНК появляется в кровотоке матери уже с 4-й недели эмбрионального развития, но на столь раннем сроке существует риск получения ложноотрицательного результата из-за низкого содержания фетальной ДНК в крови матери. К 7-й неделе содержание вкфДНК возрастает до 3-4%, а к 10-11 неделде достигает 10% от всей ДНК в плазме беременной женщины [6, 15].

В России определение пола плода по вкфДНК в крови беременной женщины предлагают многие клиники и лаборатории. Существуют и отечественные коммерческие тест-системы для определения маркёра Y-хромосомы методом ПЦР [16]. Заявленные сроки проведения анализа и его диагностическая точность в каждом отдельном случае сильно разнятся. Чаще всего предлагается проводить тестирование на 10-11 неделе беременности, но есть и предложения провести высокоточное исследование (98%) на 5-6 или 6-7 неделе.

Цель исследования – оценка на разных сроках беременности клинической эффективности теста на выявление маркёра Y-хромосомы по гену *TSPY* в плазме крови беременной женщины методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Материал и методы. Исследованы образцы плазмы крови, взятые у 4616 беременных женщин с одноплодной беременностью. Все женщины подписывали информированное согласие перед выполнением исследований. Срок беременности определяли на основании данных

УЗИ, либо по первому дню последней менструации (далее эмбриональный и акушерский сроки, соответственно). Для женщин, у которых заявлен только акушерский срок, эмбриональный определяли путём вычитания 2-х недель от акушерского. Распределение обследованных женщин по срокам беременности приведено в табл. 1. Минимальный эмбриональный срок беременности составлял 4 нед, максимальный – 32 недели.

Взятие образцов венозной крови проводили с использованием вакуумных пробирок с $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, объёмом 5-6 мл. Плазму крови отделяли от форменных элементов путём центрифугирования при 3000 г в течение 10 мин, плазму крови переносили в стерильные микропробирки объёмом 1,5 мл. Отделение плазмы крови производили не позднее, чем через 24 час от момента взятия крови с целью сокращения доли материнской геномной ДНК, высвобождающейся из клеток в результате спонтанного лизиса. Полученные образцы плазмы крови дополнительно центрифугировали при 13000 г в течение 3 мин, 0,5 мл полученного супернатанта использовали для выделения вкфДНК.

Выделение вкфДНК проводили с использованием набора «Рибосорб» (Интерлабсервис, Москва) в соответствии с инструкцией производителя с небольшими отступлениями: вместо стандартных 100 мкл для выделения использовали 500 мкл плазмы крови, финальную экстракцию ДНК проводили в 80 мкл H_2O .

Выделенную ДНК анализировали методом ПЦР-РВ с использованием набора для амплификации участка гена *TSPY* (ООО «Нанодиагностика», Россия). Прохождение реакции регистрировали по расщеплению Taqman-зонда, меченного флуоресцентным красителем. Общий объём реакционной смеси составлял 30 мкл, из которых 5 мкл составляла проба. Эффективность амплификации гена *TSPY* составляла 95%, предел чувствительности – 60 копий/мкл. Качество выделения ДНК контролировали методом ПЦР-РВ по амплификации генов *GAPDH* или *BIRC5* с использованием наборов ООО «Нанодиагностика». Для повышения достоверности амплификацию каждого маркера проводили в нескольких повторях: *TSPY* – в 4-х, *GAPDH* и *BIRC5* – в 2-х повторностях. Помимо тестируемых образцов, в каждую постановку включали положительный и отрицательный контроли ПЦР и отрицательный контроль выделения ДНК, для исключения ложноположительных результатов, вызванных контаминацией растворов.

ПЦР проводили в амплификаторах Bio-Rad CFX96 (США). Режим амплификации: предварительный прогрев при 95° С 10 мин; 50 циклов со следующими характеристиками: 95° С – 10 с, 60° С – 20 с, 72° С – 10 с; фиксацию уровня флуоресценции производили при 60° С.

Результаты ПЦР классифицировали по трём категориям: женский пол плода, мужской пол плода, мужской пол плода с пониженной достоверностью. Заключение о женском поле плода принималось только в случае отсутствия амплификации гена *TSPY* по крайней мере в двух из 4-х повторях реакции (см. рисунок, а). Пол плода признавали мужским, если во всех повторях реакции для данного образца кривые амплификации гена *TSPY* имели сходную динамику нарастания флуоресцентного сигнала, превышающего пороговый уровень не позднее 38 цикла (см. рисунок, б). Если кривые амплификации гена *TSPY* для одного образца воспроизводились во всех или большинстве репликах реакции, но в разных репликах демонстрировали различную динамику: поздние *St*,

различные *St* в разных репликах, низкую и разную интенсивность разгорания, то пробу относили к категории «мужской пол с пониженной достоверностью» (см. рисунок, в), т. к. амплификационные кривые в таких паттернах по времени появления и по динамике разгорания похожи на контаминационные сигналы. Если амплификационные кривые имели очень поздние *St* со значительными различиями в динамике разгорания в повторях, то пол плода считали неопределённым (см. рисунок, г) и проводили повторное исследование.

Для 1680 женщин результаты молекулярного анализа сравнивали с данными УЗИ обследования на 20-22-й неделе беременности. Для 378 женщин результаты ПЦР тестирования сравнили с анатомической идентификацией пола ребёнка после родов. По результатам верификации рассчитаны чувствительность, специфичность, диагностическая точность, положительная и отрицательная прогностические ценности (positive predictive value, negative predictive value) метода.

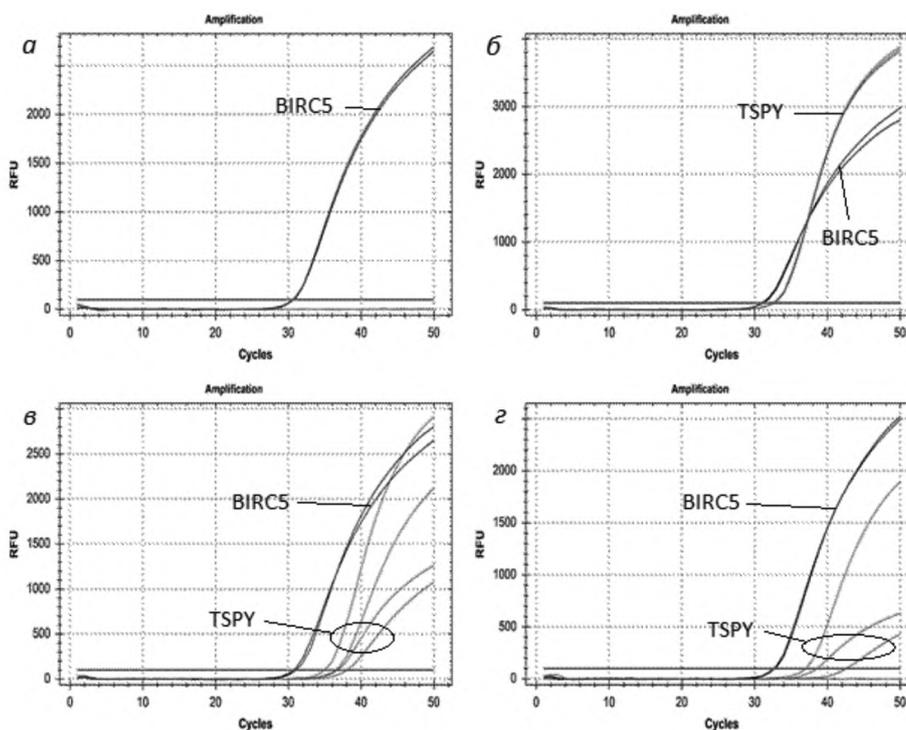
Результаты и обсуждение. Маркер Y-хромосомы однозначно выявлен в 2131 образце (табл. 2), что составило 46,2% от общего числа проанализированных проб. С пониженной достоверностью маркер Y-хромосомы выявлен в 233 образцах (5%), в 15 образцах (0,3%) при первичном исследовании однозначного заключения о наличии или отсутствии в плазме Y-специфичной ДНК сделать не удалось.

Если исключить результаты проб на сроках менее 5 недель, когда вкфДНК может ещё не появиться в крови женщины, то статистика выявления Y-специфичной ДНК в зависимости от срока беременности, на котором выполнялся анализ, демонстрирует определённые закономерности: доля анализов с однозначно выявленным *TSPY*-маркером растёт от 27% при 4-5-ти недельной беременности и достигает максимума 48-49% к 8-й неделе беременности, и далее держится на этом уровне; доля результатов с выявленным Y-специфичным маркером с пониженной достоверностью, напротив, уменьшается с 10 до 1-1,5% в тех же диапазонах сроков беременности (табл. 2). Если сложить число проб, классифицированных как «мужские» и «мужские с пониженной достоверностью», то в сумме они дают показатель, близкий к 50% во всем диапазоне проанализированных сроков беременности, что свидетельствует, что пробы с нестабильными Y-специфичными сигналами, как правило, могут интерпретироваться в пользу мужского пола, однако интерпретация результатов с пониженной достоверностью для индивидуальной женщины имеет повышенный риск неверного определения пола плода.

Таблица 1

Количество обследованных женщин на разных сроках беременности

Эмбриональный срок (нед)	Число женщин
4-6	338
6-8	1772
8-12	2193
12-25	305
26-32	8
Всего	4616



Кривые амплификации генов *TSPY* и *BIRC5*.

a – женский пол плода; *б* – мужской пол плода; *в* – мужской пол плода с пониженной достоверностью; *г* – пол плода не определен.

Таблица 2

Определение пола на основе выявления маркера *TSPY* на разных сроках беременности

Число женщин	Эмбриональный срок (нед)	Y ⁺ (в %)	Y ⁺ с пониженной достоверностью (в %)	Результат не определен (в %)
4616	4-35	46,2	5,0	0,3
В том числе:				
37	4-5	27,0	5,4	0
835	5-6	38,4	10,4	0,5
1562	6-7	44,8	7,7	0,3
1360	7-8	48,5	3,2	0,2
1699	8-9	49,0	1,4	0,1
886	9-10	48,8	0,9	0,2
517	10-12	49,9	1,2	0,8
311	12-32	47,3	0,6	1,0

Примечание. Пробы, попадающие в пограничные сроки беременности, включены в состав обеих соседних выборок.

Для 316 женщин (в основном на сроках беременности до 10 нед) исследование проводили повторно с независимым забором крови через 5-10 дней. Повторное исследование на сроках беременности более 7 недель в подавляющем числе случаев подтверждало первоначальный результат, но в одном случае позволило выявить техническую ошибку, допущенную при первичном исследовании. На сроках беременности до 7 недель повторный анализ позволял снять сомнения, возникающие при получении нестабильных Y-специфичных сигналов.

Наиболее ранние сроки, на которых у женщин выявляли Y-специфичную вкфДНК, – 4 эмбриональные недели (см. табл. 2), что соответствует данным литературы

[6]. Учитывая статистику положительных результатов «с пониженной достоверностью», нельзя исключать получение ложноотрицательных результатов в силу как индивидуальных особенностей развития нормальной беременности, так и отклонения от нормального протекания беременности, например, задержка развития плода, нарушение кровоснабжения плаценты и т. д., которые могут приводить к смещению времени появления и к изменению концентрации вкфДНК в кровотоке [6, 7]. На практике следует учитывать и повышенную погрешность в определении начала беременности при сроках менее 7 нед, что в случае его ошибочного завышения может привести к ложноотрицательным результатам.

Минимальным сроком беременности, на котором рационально проводить определение пола плода, следует признать срок после 7 эмбриональных недель беременности.

С технической точки зрения анализ циркулирующей вкфДНК характеризуется гиперчувствительностью вследствие работы с крайне низкими концентрациями мишени. В сочетании с высокой чувствительностью метода ПЦР это существенно увеличивает риск получения ложноположительных результатов по причине контаминации. Кривые амплификации контаминационных сигналов обладают поздним Ct и не воспроизводятся при повторном исследовании. Единичные всплески контаминационных кривых встречались регулярно, несмотря на строгое соблюдение правил технологического регламента, направленных на предотвращение молекулярной контаминации. Такие спорадические артефакты относительно легко идентифицировались при тестировании проб в нескольких повторях. В нашей практике маркер *TSPY* сначала диагностировали в 5 повторях, затем, в результате совершенствования организации диагностического процесса, их количество сокращено до четырёх. Дальнейшее сокращение числа повторов, по нашему мнению, привело бы к увеличению доли результатов «с пониженной достоверностью». Дифференцировать контаминационные сигналы от истинных особенно важно на ранних сроках беременности, так как из-за крайне низкой концентрации ДНК мишени они могут совпадать по Ct.

Сопоставление результатов ПЦР-тестирования с результатами родов выявило 8 случаев несовпадений (табл. 3). Несовпадения в равной степени касались как выявления, так и невыявления маркера Y-хромосомы, но если на сроках до 6 недель несовпадения приходились на невыявление маркера, и могут быть объяснены недостаточной концентрацией вкфДНК, то после 6 недель преобладали несовпадения, вызванные ошибочным выявлением маркера, что может быть вызвано контаминацией.

Отмечено 8 случаев несовпадения результатов ПЦР-тестирования с результатами ультразвукового обследования (УЗИ), проводимого на более поздних сроках (табл. 3). В 5-ти случаях родоразрешение подтвердило заключение генетического анализа, в двух случаях результаты родоразрешения остались неизвестными из-за утраты связи с пациенткой. В одном случае ошибочным оказался результат генетического анализа. Повторное

исследование спорной плазмы крови, хранившейся в архиве при -45°C , показал несовпадение с результатом первого анализа, что свидетельствует о технической ошибке, допущенной при выполнении первого анализа. Более точное определение пола плода методом ПЦР по сравнению с УЗИ не является неожиданностью, поскольку правильность ультразвуковой диагностики существенно зависит от предлежания плода, применяемой аппаратуры и квалификации врача.

Рассматривая случаи несоответствия результатов ПЦР-тестирования, данных УЗИ и послеродового фенотипа ребёнка помимо ошибок диагностического процесса нельзя исключить случаи, связанные с нарушением половой дифференциации (НПД, disorders of sex development, DSDs), которые могут проявляться на хромосомном, гонадном и анатомическом уровнях [17, 18]. В частности, документированы люди с мужскими наружными половыми органами, имеющие кариотип 46, XX [19-22] и люди с кариотипом 46, XY и с женскими половыми органами [23-24].

По некоторым оценкам синдром 46, XX НПД встречается с частотой 1:20000 новорожденных мальчиков [25] с различными клиническими проявлениями: неоднозначные мужские наружные гениталии, бесплодие или гипогонадизм; синдром 46, XY НПД встречается с частотой 6,4:100 000 новорожденных девочек [23].

Рассчитанные на основании полученных данных аналитические показатели использованной методики определения пола плода приведены в табл. 4. Расчёт чувствительности и специфичности для разных сроков беременности показывает, что на сроках до 6 недель снижена чувствительность (93,1% по сравнению с 97,6-100% для более поздних сроков) и отрицательная прогностическая ценность (90,9% по сравнению с 97-100% для более поздних сроков). Полученные показатели чувствительности и специфичности определения пола плода для сроков от 7 недель соответствуют наивысшим показателям, описанным в литературе различными авторами [12-15].

Заключение. ПЦР-РВ позволяет определять маркер Y-хромосомы во многих случаях уже на 5-6 й неделе беременности, но из-за проблем спонтанной контаминации или возможного нарушения нормального протекания беременности клиническая чувствительность и отрицательная прогностическая ценность теста на этих сроках снижена. Начиная с 7-й эмбриональной недели беременности чувствительность метода превышает

Таблица 3

Результаты пренатального ПЦР-анализа и послеродового определения пола

Число опрошенных женщин	Срок беременности эмбриональный (нед)	Выявлен маркер Y	Всего несовпадений (n)	Несовпадений с данными родов (n)	Несовпадений в результате технических ошибок* (n)	Несовпадений среди выявленных (n)	Несовпадений среди невыявленных (n)
450	4-28	244	11	8	3	6	5
В том числе:							
44	4-6	27	2	1	1	0	2
217	6,5-8,5	119	4	3	1	3	1
150	9-12	78	4	3	1	2	2
39	13-28	20	1	1	0	1	0

Примечание. * – Несовпадение имело место только при первичном ПЦР анализе; при повторном анализе того же образца результаты ПЦР анализа совпали с фенотипом пола после родов.

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

97,6%, хотя и более поздние сроки не гарантируют 100% совпадения результатов генетического анализа с фенотипической дифференциацией половых органов. Вторичное определение пола плода с независимым заборами крови с интервалом в несколько дней увеличивает диагностическую точность теста методом ПЦР практически до 100%, сводя к минимуму возможность ошибок.

Наиболее ранний срок беременности, позволяющий получить результат с высокой диагностической точностью, является 7-я неделя эмбрионального развития.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 5-14, 17-25)
см. REFERENCES

4. Брызгунова О.Е., Лaktionov П.П. Формирование пула циркулирующих ДНК крови: источники, особенности строения и циркуляции. *Биомедицинская химия*. 2015; 61(4): 409-26.
15. Веропотвелян Н. П., Погуляй Ю.С. Неинвазивная пренатальная диагностика: истоки, реалии, ближайшие перспективы. *Здоровье женщины*. 2013; 77: 65-71.
16. Тороповский А.Н., Никитин А.Г., Жмырко Е.В., Скороходов Л.С., Беляков А.В., Викторов Д.А. Анализ показателей информативности наборов реагентов «ТЕСТ-SRY» и «ТЕСТ-RHD» при определении пола и резус-фактора плода. *Фундаментальные исследования*. 2014; 10: 1566-71.

REFERENCES

1. Finning K.M., Chitty L.S. Non-invasive fetal sex determination: Impact on clinical practice. *Semin. Fetal Neonat. Med.* 2008; 13(2): 69-75.
2. Odeh M., Granin V., Kais M., Ophir E., Bornstein J. Sonographic fetal sex determination. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2009; 64(1): 50-7.
3. Lo Y.M.D., Corbetta N., Chamberlain P.F., Rai V., Sargent I.L., Redman C.W.G., Wainscoat J.S. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997; 350(9076):485-7.
4. Bryzgunova O.E., Laktionov P.P. Generation of blood circulating DNA: the sources, peculiarities of circulation and structure. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2015; 61(4): 409-26. (in Russian)
5. Hui L. Noninvasive Approaches to Prenatal Diagnosis: Historical Perspective and Future Directions. *Methods in Molecular Biology*. 2019; 1885: 45-58.
6. Guibert J., Benachi A., Grebille A.G., Ernault P., Zorn J.R., Costa J.M. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real-time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.* 2003; 18(8): 1733-6.
7. Rijnders R.J.P., Van Der Luijt R.B., Peters E.D.J., Goeree J.K., Van Der Schoot C.E., Ploos Van Amstel J.K., Christiaens G.C. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat. Diagn.* 2003; 23: 1042-4.
8. Lo Y.M., Zhang J., Leung T.N., Lau T.K., Chang A.M.Z., Hjelm N.M. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 64: 218-24.
9. Hui L., Vaughan J.I., Nelson M. Effect of labor on postpartum clearance of cell-free fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat. Diagn.* 2008; 28: 304-8.
10. Gratacos E., Nicolaides K. Clinical Perspective of Cell-Free DNA Testing for fetal aneuploidies. *Fetal Diagn. Ther.* 2014; 35(3): 151-228.
11. Chiu R.W., Lo Y.M. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma the coming of age. *Semin. Fetal Neonat. Med.* 2011; 16: 88-93.
12. Devaney S.A., Palomaki G.E., Scott J.A., Bianchi D.W. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: A systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011; 30(6): 627-36.
13. Wright C.F., Wei Y., Higgins J.P., Sahoo G.S. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. *BMC Res. Notes*. 2012; 5: 476.
14. Mackie F.L., Hemming K., Allen S., Morris R.K., Kilby M.D. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG*. 2017; 124(1): 32-46.
15. Veropotvelyan M.P., Pogulyay Y.S. Noninvasive prenatal diagnosis: origins, realities, immediate prospects. *Zdorov'e zhenshchiny*. 2013; 77: 65-71. (in Russian)
16. Toropovskiy A.N., Nikitin A.G., Zhmyrko E.V., Skorokhodov L.S., Belyakov A.V., Viktorov D.A. The analysis of indicators informativeness for the reagent kits «TEST-SRY» and «TEST-RHD» when determining sex and fetal rh factor. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 10: 1566-71. (in Russian)
17. Hughes I.A. Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008; 22: 119-34.
18. Kim K.S., Kim J. Disorders of sex development. *Korean J. Urol.* 2012; 53(1): 1-8.
19. Anik A., Catli G., Abaci A., Böber E. 46,XX male disorder of sexual development: a case report. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 2013; 5: 258-60.
20. Lonardo F., Cantalupo G., Ciavarella M., Monica M.D., Lombardi C., Maioli M., Masella L., Nazzaro A., Scarano G. Prenatal diagnosis of 46, XX testicular DSD. Molecular, cytogenetic, molecular-cytogenetic, and ultrasonographic evaluation. *Prenat. Diagn.* 2009; 29: 998-1001.
21. Zenteno J.C., Lopez M., Vera C., Mendez J.P., Kofman-Alfaro S. Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity. *Hum. Genet.* 1997; 100: 606-10.
22. Zenteno-Ruiz J.C., Kofman-Alfaro S., Mendez J.P. 46, XX sex reversal. *Arch Med Res.* 2001; 32: 559-66.
23. Berglund A., Johannsen T.H., Stochholm K., Viuff M.H., Fedder J., Main K.M., Gravholt C.H. Incidence, prevalence, diagnostic delay, and clinical presentation of female 46,XY disorders of sex development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016; 101(12): 4532-40.
24. Jung E.J., Im D.H., Park Y.H., Byun J.M., Kim Y.N., Jeong D.H., Sung M.S., Kim K.T., An H.J., Jung S.J., Lee K.B. Female with 46, XY karyotype. *Obstet. Gynecol. Sci.* 2017; 60(4): 378-82.
25. Chapelle A., Hortling H., Niemi M., Wennström J. XX sex chromosomes in a human male. *Acta Med. Scand.* 1964; 175: 25-8.