

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 63
4 • 2018

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

АПРЕЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

Телефон редакции:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л. А. Шанкина

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. 8-903-724-40-29

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

Художественный редактор

Е. М. Архипова

Переводчик *В. С. Нечаев*

Корректор *В. С. Смирнова*

Технический редактор *Л. В. Зюкина*

Сдано в набор 20.02.2018.

Подписано в печать 20.03.2018.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

Отпечатано в ООО "ПОЛИ ПРИНТ
СЕРВИС", 119049, г. Москва,
Калужская пл., д. 1, корп. 2

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.aks.ru,

www.pressa-rf.ru

Подписка на электронную версию:

elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2018. № 4. 193–256.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. Н. ТИТОВ

А. Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В. В. ДОЛГОВ, Г. Н. ЗУБРИ-
ХИНА, А. А. ИВАНОВ, С. А. ЛУГОВСКАЯ, А. Ю. МИ-
РОНОВ (зам. главного редактора), В. Т. МОРОЗОВА,
Л. М. ПИМЕНОВА (ответственный секретарь), Л. М. СКУ-
ИНЬ, А. А. ТОТОЛЯН, И. П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (*Ташкент*), Т.В. ВАВИЛОВА (*Санкт-Пе-
тербург*), I. WATSON (*Великобритания, Ливерпуль*),
А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (*Уфа*), Д.А. ГРИЩЕНКО (*Красно-
ярск*), В.С. ГУДУМАК (*Кишинёв*), Н.Г. ДАШКОВА (*Москва*),
В.А. ДЕЕВ (*Киев*), Т.И. ДОЛГИХ (*Омск*), С.А. ЕЛЬЧАНИНО-
ВА (*Барнаул*), А.В. ИНДУТНЫЙ (*Омск*), А. KALLNER (*Шве-
ция, Стокгольм*), А.И. КАРПИЩЕНКО (*Санкт-Петербург*),
К.П. КАШКИН (*Москва*), Г.И. КОЗИНЕЦ (*Москва*),
А.В. КОЗЛОВ (*Санкт-Петербург*), В.Г. КОЛБ (*Минск*).
Г.В. КОРШУНОВ (*Саратов*), Г.М. КОСТИН (*Минск*), А.Г. КО-
ЧЕТОВ (*Москва*), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (*Москва*), Г.Г. ЛУНЕ-
ВА (*Киев*), А.Р. МАВЗЮТОВ (*Уфа*), В.Н. МАЛАХОВ (*Москва*),
Д.Д. МЕНЬШИКОВ (*Москва*), В.И. НИГУЛЯНУ (*Кишинёв*),
Е.Н. ОВАНЕСОВ (*Москва*), Ю.В. ПЕРВУШИН (*Ставрополь*),
И.В. ПИКАЛОВ (*Новосибирск*), Ю.П. РЕЗНИКОВ (*Мос-
ква*), Д.Б. САПРЫГИН (*Москва*), С.Н. СУПЛОТОВ (*Тюмень*),
О.А. ТАРАСЕНКО (*Москва*), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (*Моск-
ва*), А.Б. УТЕШЕВ (*Алматы*), Л.А. ХОРОВСКАЯ (*Санкт-
Петербург*), С.В. ЦВИРЕНКО (*Екатеринбург*), А.Н. ШИ-
БАНОВ (*Москва*), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (*Санкт-Петербург*),
Г.А. ЯРОВАЯ (*Москва*)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 63
4 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

APRIL

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

ADVERTISING DEPARTMENT

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor E.M. Arkhipova

Translator V.S. Nechaev

Proof-reader V.S. Smirnova

Layout editor L.V. Zyukina

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief V. N. TITOV

A. B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRICH-
NA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, A.Yu. MIRO-
NOV (assistant editor-in-chief), V.T. MOROZOVA,
L.M. PIMENOVA (executive editor), L.M. SKUIN', A.A.
TOTOLYAN, I.P. SHABALOVA

EDITORIAL COUNCIL:

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*),
I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV (*Ufa*),
D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK (*Kishinev*),
N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*), T.I. DOLGIKH
(*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*), A.V. INDUTNY (*Omsk*),
V.A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO
(*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), G.I. KOZINEC
(*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), V.G. KOLB
(*Minsk*), G.V. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*),
A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*),
G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MAVZYTОВ (*Ufa*), V.N. MALACHOV
(*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), V.I. NIGULYANU
(*Kishinev*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN
(*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNICOV
(*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV
(*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKIY
(*Moscow*), A.B. UTESHEV (*Almati*), L.A. KHOROVSKAYA
(*Sankt-Peterburg*), S.V. TSVIRENKO (*Ekaterinburg*),
A.N. SHIBANOV (*Moscow*), V.L. EMANUEL' (*Sankt-Peter-
burg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Рожкова Т.А., Каминная В.И., Алчинова И.Б. Атеросклероз и атероматоз – два последовательных нарушения метаболизма, патология биологических функций трофологии и функции эндоекологии. Основы профилактики ишемической болезни сердца 196
- Гильмиярова Ф.Н., Гусякова О.А., Балдина О.А., Ерещенко А.А., Меженкова И.А., Арчибасова О.В., Халиулин А.В., Сосновская Л.В. Влияние гипергликемии на показатели биохимического анализа крови *in vitro* 205
- Орлова Н.В., Спирыкина Я.Г., Морун О.Е. Определение уровня кортизола в плазме крови пациентов с артериальной гипертензией при разной степени устойчивости к стрессорным воздействиям 210
- Соколов А.В., Костина Д.А., Маринчев С.С., Чаплыгин С.С., Колсанов А.В. Значимость определения нитритов в ротовой жидкости у здоровых людей. 215
- Черников А.В., Самоходская Л.М., Дзитиев В.К., Камалов А.А. Сравнительная характеристика методов проточной цитофлуориметрии и оптической микроскопии в количественном исследовании элементов мочи 220
- Евстратенко В.В., Севбитов А.В., Платонова В.В., Селифанова Е.И., Дорофеев А.Е. Особенности кристаллизации смешанной слюны у пациентов, употребляющих героин и метадон. 223

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Мининкова А.И., Луговская С.А., Почтарь М.Е., Хуажева Н.К., Тлевтсезьева А.А., Воробьев В.И., Лаврентьев И.С., Емельянова Э.Б., Долгов В.В. Диагностический скрининг острых лейкозов с использованием новых технологий автоматизированного анализа крови 228

КОАГУЛОЛОГИЯ

- Габбасов З.А., Козлов С.Г., Мельников И.С., Бязрова С.В., Сабурова О.С., Прокофьева Л.В. CD45-положительные тромбоциты и отношение уровня нейтрофилов к лимфоцитам в оценке риска развития рестеноза у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2-го типа 233

ИММУНОЛОГИЯ

- Агарков Н.М., Головченко О.В., Охотников О.И., Будник И.В., Аксёнов В.В., Иванов В.А. Совершенствование диагностики острого эндометрита на основе моделирования и кластерного анализа параметров местного иммунитета 239
- Смирнова Д.Н., Богачева Н.В., Дармов И.В. Разработка экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности CagA *Helicobacter pylori* 242
- Сахнов С.Н., Харченко В.В. Диагностика и прогнозирование глаукомы. 246

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Карцев Н.Н., Светоч Э.А., Еришова М.Г., Абросимова Г.Н., Тазина О.И., Пинчук А.С., Фурсова Н.К., Шепелин А.П., Дятлов И.А. Характеристика диареогенных эшерихий, выделенных от детей в возрасте до 5 лет в г. Ярославле 249
- Харсеева Г.Г., Щербатая О.С., Лабушкина А.В. Антибиотикочувствительность *Corynebacterium diphtheriae* gravis tox⁺ в составе смешанных биоплёнок 253

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Rozhkova T.A., Kaminnaya V.A., Alchinova I.B. Atherosclerosis and atheromatosis are consecutive metabolic disorders. pathology of the biological functions of trophology and endoeology is the basis for ischemic heart disease prevention 196
- Gilmiyarova F.N., Gussyakova O.A., Baldina O.A., Ereschenko A.A., Mezhenkova I.A., Archibasova O.V., Khaliulin A.V., Sosnovskaya L.V. The effect of hyperglycemia on indices of biochemical blood analysis *in vitro* 205
- Orlova N.V., Spiryakina Ya.G., Morunov O.E. The detection of cortisol level in blood plasma of patients with arterial hypertension at resistance to stress impacts of various degree 210
- Sokolov A.V., Kostina D.A., Marinchev S.S., Chaplygin S.S., Kolsanov A.V. The significance of detection of nitrites in oral fluid of healthy people 215
- Chernikov A.V., Samokhodskaya L.M., Dzitiev V.K., Kamalov A.A. The comparative characteristic of methods of flow cytofluorometry and optical microscopy in qualitative study of urine elements 220
- Evstratenko V.V., Sevbitov A.V., Platonova V.V., Selifanova E.I., Dorofeev A.E. The characteristics of crystallization of mixed saliva in patients using heroin and methadone 223

HEMATOLOGY

- Mininkova A.I., Lugovskaya S.A., Pochtar M. E., Khuazheva N.K., Tlevtsezheva A.A., Vorobiev V.I., Lavrentiev I.S., Emelyanova E.B., Dolgov V.V. The diagnostic screening of acute leukemia using new technologies of automated blood analysis 228

COAGULOGY

- Gabbasov Z.A., Kozlov S.G., Melnikov I.S., Byazrova S.V., Saburova O.S., Prokofieva L.V. The CD45-positive thrombocytes and neutrophils/lymphocytes level ratio in evaluation of risk of development of re-stenosis in patients with chronic ischemic heart disease and diabetes mellitus type II 233

IMMUNOLOGY

- Agarkov N.M., Golovchenko O.V., Okhotnikov O.I., Budnik I.V., Aksenov V.V., Ivanov V.A. The development of diagnostic of acute endometritis on the basis of modeling and cluster analysis of parameters of local immunity 239
- Smirnova D.N., Bogacheva N.V., Darmov I.V. The development of experimental sample of immune chromatographic test-system for detecting protein of pathogenicity of CagA *Helicobacter pylori* 242
- Sakhnov S.N., Kharchenko V.V. The diagnostic and prognostication of glaucoma 246

MICROBIOLOGY

- Kartsev N.N., Svetoch E.A., Ershova M.G., Abrosimova G.N., Tazina O.I., Pinchuk A.S., Fursova N.K., Shepelin A.P., Dyatlov I.A. The characteristic of diarrheagenic Escherichia separated from children aged under 5 years old in Yaroslavl 249
- Kharseeva G.G., Scherbataya O.S., Labushkina A.V. The antibiotic sensitivity of *Corynebacterium diphtheriae* gravis tox⁺ in composition of mixed biofilms 253

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.13-004.6-092-084

Титов В.Н.¹, Рожкова Т.А.¹, Каминная В.И.¹, Алчинова И.Б.²

АТЕРОСКЛЕРОЗ И АТЕРОМАТОЗ – ДВА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА, ПАТОЛОГИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ ТРОФОЛОГИИ И ФУНКЦИИ ЭНДОЭКОЛОГИИ. ОСНОВЫ ПРОФИЛАКТИКИ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, 121552, Москва;

²ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАН, 125315, Москва

Атеросклероз и атероматоз – два разных афизиологических процесса с разными факторами этиологии и разным патогенезом; это нарушение двух разных биологических функций. Согласно предложенной нами филогенетической теории общей патологии, атеросклероз – нарушение биологической функции трофологии, питания, биологической реакции экзотрофии. Атеросклероз индуцирован поеданием неоптимальной для травоядного в филогенезе вида Homo sapiens плотоядной (мясной) пищи с высоким содержанием пальмитиновой насыщенной жирной кислоты (НЖК). При этом формируется более ранний в филогенезе, менее эффективный пальмитиновый вариант метаболизма in vivo ЖК взамен высокоэффективного у травоядных олеинового метаболизма ЖК. Накопление в крови безлигандных, пальмитиновых липопротеинов (ЛП) очень низкой (ЛПОНП) и низкой плотности (ЛПНП) является результатом афизиологической реакции компенсации при переносе к клеткам пальмитиновой НЖК. Это повышение содержания в крови пальмитиновых триглицеридов (ТГ), безлигандных одноименных ЛПОНП→ЛПНП, холестерина ЛПНП (ХС-ЛПНП) с формированием гиперлипотеинемии: тип IV→тип IIb→тип V. Атероматоз устраняет последствия нарушений в ЛП путем активации биологической функции эндоэкологии («чистота» межклеточной среды) in vivo, реализуя биологическую реакцию воспаления. Это физиологичная денатурация apoB-100 в безлигандных ЛПОНП→ЛПНП нейтрофилами при перекисном окислении, опсонизация компонентами комплемента, транцитоз через монослой эндотелия, выведение в интиму артерий эластического типа – пул сбора и утилизации флогогенов из локального внутрисосудистого пула межклеточной среды. Утилизируют эндогенные флогогены ранние в филогенезе полифункциональные, оседлые макрофаги; их мало, они не пролиферируют. Обязанности их исполняют моноциты→макрофаги гематогенного происхождения; у них, однако, не экспрессирована кислая гидролаза полиеновых эфиров ХС. Атероматозные массы – это частично катаболизированные полиеновые ЖК, этерифицированные спиртом ХС, которые не смогли поглотить клетки. В реализации функции эндоэкологии атероматоз становится процессом патологической компенсации. Основа профилактики атеросклероза и атероматоза – исключение индукции афизиологичной плотоядной (мясной) пищи.

Ключевые слова: атеросклероз; атероматоз; жирные кислоты; липопротеины; интима; макрофаги.

Для цитирования: Титов В.Н., Рожкова Т.А., В.А. Каминная, Алчинова И.Б. Атеросклероз и атероматоз – два последовательных нарушения метаболизма, Патология биологических функций трофологии и функции эндоэкологии. Основы профилактики ишемической болезни сердца. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(4): 196-204. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-196-204>

Titov V.N.¹, Rozhkova T.A.¹, Kaminnaya V.A.¹, Alchinova I.B.²

ATHEROSCLEROSIS AND ATHEROMATOSIS ARE CONSEQUENT METABOLIC DISORDERS. PATHOLOGY OF THE BIOLOGICAL FUNCTIONS OF TROPHOLOGY AND ENDOECOLOGY IS THE BASIS FOR ISCHEMIC HEART DISEASE PREVENTION

¹National medical research center of cardiology, Ministry of Health, 121552, Moscow;

²FGBNU "Research Institute of General Pathology and Pathophysiology", Academy of Sciences of the Russian Federation, 125315, Moscow

Atherosclerosis and atheromatosis are different nonphysiological processes with different etiology and pathogenesis. They manifest alterations in different biological functions. According to our original phylogenetic theory of general pathology, atherosclerosis is associated with altered biological function of trophology, eating, biological reaction of exotrophy. Atherosclerosis is induced by eating of nonoptimal for phylogenetically herbivorous Homo sapiens meat diet with high content of palmitic saturated fatty acid (SFA), which leads to in vivo formation of phylogenetically early low-efficient palmitic pathway of FA metabolism instead of highly-efficient oleic pathway operating in herbivores. Accumulation of nonligand palmitic very low density lipoproteins (VLDL) and low density lipoproteins (LDL) in the bloodstream results from nonphysiological reaction of compensation upon transport of palmitic SFA to cells. An increase in blood content of palmitic triglycerides (TG) and nonligand palmitic VLDL→LDL coincides with the development of hypercholesterolemia: type IV→type IIb→type V. Atheromatosis compensates changes in lipoproteins by

Для корреспонденции: Титов Владимир Николаевич, д-р мед. наук, проф., рук. лаборатории клин. биохимии липопротеинов Института клинической кардиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ; e-mail: vn_titov@mail.ru

activation of the biological function of endoecology (purity of the extracellular medium) *in vivo*, thus fulfilling the biological reaction of inflammation. This is physiological denaturation of apoB-100 in nonligand VLDL→LDL by neutrophils via peroxidation, opsonization by the complement components, transcytosis across the endothelial monolayer and removal to the intima of elastic arteries that serves as a collection and utilization pool for phogogens from local intravascular pool of the intercellular medium. Endogenous phlogogens are utilized by phylogenetically early polyfunctional resident macrophages which are small in number and do not proliferate. Blood-borne monocytes-macrophages are also involved in this process, however, they do not express acid hydrolase of polyenic cholesteryl esters. Atheromatous masses are partially catabolized polyenic FA esterified by the alcohol cholesterol which were not internalized by cells. Atheromatosis is a process of pathological compensation in the realization of the function of endoecology. Prevention of atherosclerosis and atheromatosis should be based on elimination of the effects produced by a nonphysiological meat diet.

Key words: atherosclerosis; atheromatosis; fatty acids; lipoproteins; intima; macrophages.

For correspondence: Titov Vladimir Nikolaevich, doctor of medical sciences, professor; e-mail: vn_titov@mail.ru

For citation: Titov V.N., Rozhkova T.A., V.A. Kaminnaya, I.B. Alchinova. Atherosclerosis and atheromatosis are consecutive metabolic disorders. Pathology of the biological functions of trophology and endoecology is the basis for ischemic heart disease prevention. *Kinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63(4): 196-204. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-196-204>

Acknowledgment. This study had no sponsorship.

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

Received 01.09.2017
Accepted 10.10.2017

Еженедельное участие в клинических конференциях позволяет постоянно отслеживать отличия в представлениях об атеросклерозе и атероматозе, которые формируются у исследователей, от тех, которые реально существуют на практике. Клиницисты сплошь и рядом применяют термины «атеросклероз» и «атероматоз» как синонимы; можно услышать об атеросклерозе и об атероматозе коронарных артерий. Вместе с тем с позиций общей биологии и медицины это два разных, согласно факторам этиологии и особенностям патогенеза, в равной мере исходно физиологичных процесса, которые реализованы *in vivo* вне сомнения филогенетическим, физиологичным путем, но, к сожалению, с определенными отклонениями [1].

Распространена идиома: «дьявол кроется в мелочах» (*the devil is in the details*). Это означает, что в любой проблеме, в том числе в патогенезе физиологичных процессов *in vivo*, есть мелкие потенциальные нарушения, на которые мы пока не обратили внимания [2]. Недосмотр наш, казалось бы, локализован не в столь функционально значимом месте [3], исходно физиологичный процесс нередко превращают в явно афизиологичный и даже патологический [4]. Процессы физиологичной компенсации *in vivo*, которые отработаны в филогенезе, не всегда являются стойкими. Так происходит с семью метаболическими пандемиями, которые с высокой частотой распространены в популяциях развитых стран мира. Ими, по нашему мнению, являются атеросклероз и атероматоз – два разных физиологичных, сочетанных процесса в афизиологичном исполнении; эссенциальная, метаболическая артериальная гипертензия; синдром резистентности к инсулину (синдром ИР); метаболический синдром; ожирение; неалкогольная жировая болезнь печени и эндогенная гиперурикемия [5]. Общим для этих афизиологичных состояний (за исключением эндогенной гиперурикемии) является значимое нарушение метаболизма жирных кислот (ЖК) [6]. Согласно этиологическим факторам, сформированным на разных ступнях филогенеза, метаболические пандемии в этиологии выражены разные, но имеют много общего в патогенезе.

Немецкий естествоиспытатель, философ Э. Геккель, автор терминов «филогенез» (единый анамнез всего живого), «онтогенез» (анамнез особи), «экология», разработал в 1886 г. теорию происхождения многоклеточных. Он же сформулировал биогенетический закон: в индивидуальном развитии, в онтогенезе организмы как бы воспроизводят основные этапы филогенеза, эволюции всего живого. Немецкий исследователь Р. Вирхов в 1846 г. разработал клеточную теорию

общей патологии, которой мы пользуемся (теоретически) и по настоящее время. Несколькими годами ранее (2012) мы объединили две теории и на этой основе сформировали современную, филогенетическую теорию общей патологии [7]. Мы надеялись, что новая теория поможет разобраться в этиологии и патогенезе метаболических пандемий; эту патологию именуют и «болезнями цивилизации». ВОЗ не считает метаболические пандемии нозологическими формами заболевания.

Филогенетическая теория общей патологии, этиология и патогенез атеросклероза и атероматоза. В процессе эволюции, на ступенях филогенеза произошло формирование биологических функций, среди которых мы выделили семь: биологическую функцию трофологии; функцию гомеостаза; биологическую функцию эндоэкологии; функцию адаптации; биологическую функцию продолжения вида; биологическую функцию локомоции и когнитивную биологическую функцию, высшим проявлением которой является интеллект.

Мы считаем очевидным тот факт, что согласно биогенетическим основам общей биологии, которые сформулировал Э. Геккель, функциональное единение фило- и онтогенеза, нарушения биологических функций и биологических реакций, которые реализованы *in vivo*, заложены в патогенезе каждого физиологичного и патологического процесса; медицина – наука историческая. Исходя из этого этиологию и патогенез каждого процесса рационально рассматривать в динамике, на ступенях филогенеза. Основными приёмами общей биологии и медицины как составной ее части являются единение структуры и функции; единение основных этапов фило- и онтогенеза; единая технология становления в филогенезе функциональных систем; применение системного подхода общей биологии для объяснения происходящего *in vivo*. Мы предлагаем включить в перечень методологических приёмов общей биологии ещё два: преемственность становления на ступенях филогенеза биологических функций, биологических реакций; методологический приём «биологической субординации».

Согласно биологической преемственности, каждая из биологических функций и биологических реакций совершенствуется в первую очередь не путем возникновения чего-то совсем нового (это удел генетических мутаций), а путем длительного развития того, что сформировано на ранних ступенях филогенеза. Приём «биологической субординации» состоит в том, что новый гуморальный (гормональный) медиатор регуляции метаболизма *in vivo* органично надстраивается над действующими факторами, функционально с ними

взаимодействует, но изменить регуляторное действие филогенетически более ранних гуморальных медиаторов более поздний не может.

Филогенез (греч. *phylon* - племя, раса, и *genetikos* - имеющий отношение к рождению) - развитие видов; филогенез – единый анамнез всего живого. Общая патология выясняет этиологические факторы, закономерности становления и развития (патогенез) афизиологичных процессов и болезней, нарушения метаболизма, функции дистального и проксимального отделов кровообращения, нарушения роста и многостороннего развития *in vivo* и исход заболеваний. Поддержание постоянства межклеточной среды организма, стабильность параметров приватизированного каждой особью «кусочка» третьего мирового океана, в котором в той же филогенетически постоянной среде *in vivo* функционируют все клетки, обеспечивая разные биологические функции, – это биологическая реакция трофологии (питания); реакция гомеостаза и биологическая реакция эндозкологии. Среди биологических функций *in vivo* функция трофологии, индукция субстратом является основополагающей [8]. Это определено тем, что животные организмы в большинстве своем являются гетеротрофами. Можно утверждать, что основой всех метаболических пандемий у травоядного в филогенезе вида *Homo sapiens* в первую очередь является нарушение функции трофологии, выраженная индукция афизиологичным плотоядным субстратом, мясной пищей или просто избыточным ее количеством [9].

Функция гомеостаза, мы полагаем, означает, что в межклеточной среде для каждой из клеток всегда всего достаточно; эту функцию реализуют сотни биохимических реакций, которые продуцируют, поддерживают оптимальную концентрацию в плазме крови каждого из анализов путем активации его синтеза и катаболизма. Биологическая функция эндозкологии, мы считаем, означает, что в межклеточной среде всегда «чисто», не повышено *in vivo* содержание ни малых, ни больших физиологичных, афизиологичных и явно патологических флогенов – инициаторов биологической реакции воспаления.

Биологическую функцию эндозкологии («чистоты» межклеточной среды) реализуют всего две биологические реакции: биологическая реакция экскреции и реакция воспаления. Биологическая реакция экскреции выводит из внеклеточной среды и организма эндогенные и экзогенные флогены с мол. массой менее 70 кДа (равно или менее мол. массы альбумина). Это происходит путем активной фильтрации их в первичную мочу через базальную мембрану гломерул нефрона, паракринно регулируемого сообщества (ПС) клеток, которые составляют структуру и функциональную основу почек. Нефроны не допускают накопления в межклеточной среде катаболитов (метаболитов), которые могут афизиологично, физико-химически воздействовать на биохимические процессы *in vivo*.

Эндогенные макромолекулы с мол. массой более 70 кДа из организма вывести невозможно; приходится их утилизировать *in vivo*, *in situ* при реализации биологической реакции воспаления. Функция биологической реакции воспаления – утилизация в первую очередь больших эндогенных флогенов – инициаторов биологической реакции воспаления [10]; клетки физиологично продуцируют их при реализации биологических функций. Это происходит и при физиологичной, запрограммированной гибели клеток, которые завершили биологический цикл, – апоптозе. Среди всех флогенов, утилизация которых происходит в рамках биологической функции воспаления, экзогенные инфекционные патогены составляют не более нескольких процентов. Утилизация *in vivo* всех эндогенных флогенов, экзогенных инфекционных патогенов и индифферентных ксенобиотиков происходит по единому алгоритму. Как и во всех биологических, биохимических реакциях, доминирующей в биологической

реакции воспаления является индукция субстратом - количество в межклеточной среде флогенов большой мол. массы. Эндогенные физиологичные флогены (лат. *phlogosis* - воспаление, синоним термина *inflammatio*) независимо от этиологических факторов их образования в онтогенезе всегда могут вызвать повреждение тканей.

Биологическую функцию адаптации реализуют следующие реакции: реакция стресса; биологическая реакция компенсации; реакция компенсаторной противовоспалительной защиты; реакции врожденного и приобретенного иммунитета [11]. Биологический стресс служит в филогенезе защитным механизмом, стереотипной реакцией *in vivo* на любые воздействия. На клеточном уровне биологическая реакция стресса стимулирует образование и активацию протеосом, усиливая процессы катаболизма в клетке, а также активирует экспрессию белков теплового шока шаперонов. Шапероны – эволюционная (филогенетически) важная система защиты клеток, уникальные ремоделирующие белки, которые способствуют выживанию клеток в условиях стресса.

Белки-шапероны предотвращают агрегацию белков с нарушенной конформацией. Это позволяет сохранить функциональную конформацию (третичную и четвертичную структуру) функционально наиболее важных протеинов. Биологическая реакция воспаления обеспечивает далее утилизацию *in vivo* всех белков-шаперонов клетками рыхлой соединительной ткани (РСТ) – оседлыми, резидентными макрофагами, в каждом из ПС клеток. Утилизация эндогенных флогенов большой мол. массы из локального пула внутрисосудистой среды происходит путем выведения их в интиму артерий эластического и смешанного типа. В проксимальном отделе артериального русла, интима артерий эластического типа оседлые полифункциональные макрофаги реализуют биологическую реакцию воспаления, биологическую функцию эндозкологии.

Любое заболевание (независимо от этиологических факторов) является нарушением биологических функций и биологических реакций. При значимом изменении физиологических условий для продолжения функции *in vivo* необходимо приспособление организма к афизиологичным условиям - адаптация (формирование оптимальных изменений) и компенсация нарушения физиологичных процессов. Биологическая реакция компенсации развивается в условиях патологии; это совокупность реакций, которые направлены на восстановление нарушенных биологических функций. Смысл реакций компенсации - восстановление функций на трех уровнях относительного биологического совершенства: на аутокринном (клеточном) уровне; в ПС клеток, органах, системах органов; на уровне организма *in vivo*. Реализация биологической функции адаптации может проявляться в форме афизиологичных процессов с элементами атрофии, гипертрофии, гиперплазии, перестройки тканей, явлениями метаплазии и дисплазии. Реализация реакция адаптации требует расхода субстратов, затрат энергии в форме аденозинтрифосфата (АТФ), активации секреции гормонов эндокринной системы и липолиза в висцеральных жировых клетках (ВЖК) сальника. При выздоровлении, возвращении метаболизма *in vivo* к исходным, физиологичным условиям механизмы адаптации становятся менее выраженными, формируя не всегда исходные условия. Окончание афизиологичного процесса биологической реакции воспаления – полное выздоровление [12].

Каким образом типы гиперлипотеинемии (ГЛП), сформировавшиеся на ступенях филогенеза, реализуют в онтогенезе нарушение биологической функции питания, функции трофологии. Э. Геккель примерно 150 годами ранее сформулировал биогенетический постулат, согласно которому в индивидуальном развитии, онтогенезе, *in vivo* всегда воспроизводятся основные этапы филогенеза. Согласно филогенетической теории общей патологии, половина типов

ГЛП при электрофорезе ЛП является следствием нарушения биологической функции трофологии. Это действие факторов внешней среды, факторов эпигенетики, функции питания, биологической реакции экзотрофии - внешнего питания. Генетически обусловленными фенотипами нарушения метаболизма является ГЛП фенотипа I, ГЛП фенотипа IIa [13] и фенотипа III. Эпигенетическими, сформированными типами ГЛП наиболее часто при нарушении биологической реакции экзотрофии являются, по нашему мнению, фенотип нормолипидемии (нет ГЛП) по данным денситометрии электрофореграмм ЛП; нечасто мы устанавливаем ГЛП типа IV; намного более часто пациенты имеют ГЛП типа IIb и редко - выраженную ГЛП типа V [14].

Согласно филогенетической теории общей патологии, на ступенях филогенеза, как мы считаем, по мере становления видов животных в океане все плотоядные были рыбадными: все они поедали себе подобных, все были экзотрофами, все субстраты они поглощали извне. В полной мере плотоядными или травоядными животные стали только на суше.

· Поедая с пищей гидрофобные ЖК, плотоядные переносили их *in vivo* в гидрофильной межклеточной среде в форме триглицеридов (ТГ) последовательно в трех классах ЛП: в апоВ-48 хиломикронах (ХМ)→апоВ-100 ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП)→апоВ-100 ЛП низкой плотности (ЛПНП) [15]. Клетки поглощали ЖК в составе ЛП, в форме гидрофобных ТГ, эфиров с трехатомным спиртом глицерином путем апоВ-100-эндоцитоза лигандных ЛПНП.

· На суше при отсутствии плотоядной пищи и изобилии растений большинство животных вымерли; небольшая часть из них все-таки стали травоядными. Они уже не поглощали с пищей ЖК в форме ТГ; ЖК стали синтезировать гепатоциты *in situ de novo* из экзогенной глюкозы; функция ХМ при этом оказалась невостребованной [16]. Из экзогенной глюкозы гепатоциты синтезировали главным образом пальмитиновую насыщенную жирную кислоту (НЖК); вариант метаболизма *in vivo* ЖК оставался, как и у рыбадных, пальмитиновым. Митохондрии, так же нарабатывают АТФ при окислении в матриксе пальмитиновой НЖК [17]. Согласно биологическому приему преемственности, функция ХМ *in vivo* потенциально сохранена.

· Через миллионы лет при становлении в филогенезе биологической функции локомоции - движения за счет сокращения поперечнополосатых, скелетных миоцитов и кардиомиоцитов инсулин, формируя систему регуляции метаболизма, в первую очередь синтеза и метаболизма ЖК, образовал новый вариант переноса ЖК в форме ТГ. Инсулин экспрессировал вариант векторного переноса только насыщенных и мононенасыщенных ЖК (НЖК + МЖК) - субстратов с целью окисления их в митохондриях инсулинзависимых клеток и синтеза в матриксе органелл макроэргического АТФ. Инсулин, регулируя метаболизм ЖК, экспрессировал синтез в гепатоцитах и инсулинзависимых подкожных адипоцитах двух новых ферментов: пальмитоил-КоА-элонгазу и стеарил-КоА-десатуразу [18]. Они активировали превращение всей синтезированной гепатоцитами *in situ de novo* из глюкозы пальмитиновой НЖК в олеиновую МЖК.

Это происходит по следующему пути: С16:0 пальмитиновая НЖК (пальмитоил-КоА-элонгаза)→С18:0 стеариновая НЖК (стеарил-КоА-десатураза)→ ω-9 цис-18:1-олеиновая МЖК [19]. Митохондрии клеток окисляют олеиновую НЖК в 4–5 раз более интенсивно, чем пальмитиновую НЖК, нарабатывая макроэргический АТФ с наиболее высокой производительностью. Инсулин сформировал векторный перенос НЖК + МЖК в форме пальмитиновых и олеиновых ТГ в составе только олеиновых ЛПОНП и поглощение их клетками путем апоЕ/В-100-эндоцитоза; образования олеиновых ЛПНП в кровотоке не происходит. При этом у травоядных животных, у которых процессы метаболизма ЖК и обеспечение энергией регулирует инсулин, перенос НЖК + МЖК к

клеткам стал еще короче. Вместе с тем все ранние на ступенях филогенеза варианты переноса ЖК в ЛП потенциально сохранили активность; функционально они неактивны только по той причине, что нет индукции специфичным субстратом. В зависимости от того, какая ЖК этерифицирована в sn-2 (среднем положении трехатомного спирта глицерина) с вторичной спиртовой группой, все ТГ мы разделили на пальмитиновые, олеиновые и линолевые. Поскольку стерическая, пространственная форма этих ТГ выражена разная, гепатоциты этерифицируют эти ТГ раздельно в пальмитиновые, олеиновые и линолевые ЛПОНП.

Так, на ступенях филогенеза биологическая функция трофологии, реакция экзотрофии и активность инсулина определили все особенности переноса ЖК в составе ЛП и поглощение их клетками; можно полагать, что так происходит и в онтогенезе. На ступенях филогенеза за миллионы лет последовательно сформировались три варианта переноса ЖК в форме ТГ в апоВ ЛП:

- I. ХМ + ЛПОНП + ЛПНП;
- II. ЛПОНП + ЛПНП;
- III. ЛПОНП.

Первый вариант переноса ЖК функционирует в межклеточной среде у рыбадных (плотоядных) при жизни в океане; это происходит при высоком, оптимальном на ранних ступенях филогенеза содержании *in vivo* экзогенной пальмитиновой НЖК; всасывают экзогенные ЖК энтероциты тонкой кишки. У рыбадных в океане и у плотоядных на суше в переносе к клеткам ЖК в форме пальмитиновых ТГ в пальмитиновых ЛП задействованы 3 класса ЛП [20].

У травоядных животных на суше (вариант II), предки которых в океане были рыбадными и которые синтез инсулина еще не начали, основу переноса ЖК *in vivo* составляла пальмитиновая НЖК, пальмитиновые ТГ переносят одноименные ЛПОНП и ЛПНП [21]. При этом эндогенную пальмитиновую НЖК синтезировали уже гепатоциты из глюкозы пищи. В связи с этим необходимости в ХМ для переноса ЖК в форме пальмитиновых ТГ не стало.

Формирование этапа III переноса в олеиновых ЛПОНП, в основном олеиновых ТГ, МЖК и оптимальное количество НЖК в составе олеиновых ТГ инициировал инсулин; это происходило при реализации биологической функции локомоции. В гепатоцитах инсулин экспрессирует превращение всей эндогенно синтезированной из глюкозы пальмитиновой НЖК в олеиновую МЖК; ее в форме олеиновых ТГ переносят только олеиновые апоЕ/В-100 ЛПОНП. Все инсулинзависимые клетки поглощают олеиновые ЛПОНП путем апоЕ/В-100-эндоцитоза; образования олеиновых ЛПНП не происходит. При электрофорезе ЛП у рыбадных (плотоядных) наиболее часто можно выявить ГЛП типа V. У травоядных до становления функции инсулина ЛП в плазме крови соответствуют ГЛП типа IV и много чаще ГЛП типа IIb. У травоядных при активной функции инсулина формируется электрофореграмма ЛП, которая выявляет отсутствие ГЛП. Три варианта переноса ЖК в ЛП на ступенях филогенеза и есть основа формирования тех же типов ГЛП в онтогенезе при индукции афизиологичной для травоядного вида *Homo sapiens* мясной, плотоядной пищей.

На ступенях филогенеза под влиянием условий внешней среды при изменениях индукции субстратом (уменьшение поступления экзогенной пальмитиновой НЖК) физиологично изменения переноса ЖК в апоВ ЛП происходили в направлении I→II→III. Можно полагать, что в онтогенезе у всех травоядных при формировании индукции афизиологичным субстратом (экзогенной пальмитиновой НЖК) негативные сдвиги *in vivo* в переносе к клеткам ЖК развиваются в афизиологичном направлении III→II→I. Обоснованно полагать, что в онтогенезе афизиологичная индукция субстратом, избыточным количеством пальмитиновой НЖК в свою очередь инициирует негативные изменения в системе ЛП. Согласно

общей биологии и постулату Э. Геккеля «онтогенез повторяет основные этапы филогенеза», можно обоснованно полагать следующее. Если травоядный в филогенезе *Homo sapiens* начинает злоупотреблять плотоядной (мясной) пищей, вместо нормолипидемии в плазме крови при электрофорезе ЛПНП начинается выявление транзитной ГЛП типа IV, далее в течение времени она превращается в ГЛП типа IIb. Если же пациент практически переходит на плотоядное питание, к переносу от энтероцитов к гепатоцитам подключаются индуцированные афизиологичным субстратом ХМ и формируется ГЛП типа V. В Германии и Чехии ГЛП типа V именуют «пивным» типом. Не исключено, что эти пациенты имеют в основе формирования типов ГЛП и генетические нарушения, и плотоядное питание их только провоцирует.

Пальмитиновые ЛПНП→ЛПНП, высокий ХС-ЛПНП – нарушение функции трофологии при индукции плотоядной пищей. При травоядном, рыбоядном питании, активной функции инсулина и синтезе гепатоцитами олеиновой МЖК в крови циркулируют только олеиновые ЛПОНП. Они переносят к клеткам С16 – С18 МЖК + НЖК в составе олеиновых ТГ; это субстраты для окисления в митохондриях, для наработки макроэргического АТФ. ЛПНП представлены преимущественно линолевыми ЛПНП; они переносят к клеткам полиеновые, экзогенные полиненасыщенные ЖК (ПНЖК) в форме эфиров со спиртом ХС, в полиеновые эфиры ХС (поли-ЭХС) как холестероларахидонат. Заметим, что НЖК двойных связей (ДС) не содержат; МЖК имеют одну ДС; у ненасыщенных ЖК (ННЖК) в цепи расположены 2 - 3 ДС и в ПНЖК – 4 - 6 ДС. Содержание олеиновых ЛПОНП достоверно отражает низкий уровень спирта глицерина (содержание ТГ) и ХС-ЛПНП в составе поверхностного монослоя липидов. ЛПНП переносят главным образом ПНЖК в форме полиеновых эфиров спирта ХС – поли-ЭХС.

При поедании мясной пищи в гепатоциты поступает возросшее количество экзогенной пальмитиновой НЖК; при оптимальном увеличении клетки физиологично этерифицируют НЖК в олеиновые ТГ и структурируют в одноименные ЛПОНП. Если количество пальмитиновой НЖК афизиологично высоко и этерифицировать ее в олеиновые ТГ не получается, гепатоциты начинают синтезировать пальмитиновые ТГ [22], структурировать их в состав пальмитиновых ЛПОНП, секретируя их в кровь. В ЛПНП возрастает содержание ТГ, пальмитиновые ЛПНП образуют полосу β-ЛПНП на электрофореграмме. В плазме крови (компенсаторно) возрастает активность печеночной глицеролидазы (ГЛГ) и содержание кофактора апоС-III, формируя при этом ГЛП типа IIb [23].

Олеиновые ТГ в одноименных ЛПОНП являются оптимальным субстратом для действия постгепариновой липопротеинлипазы и ее кофактора апоС-II [24]. Секретция гепатоцитами в кровь пальмитиновых ЛПОНП индуцирует синтез клетками печени иного фермента, оптимального для гидролиза пальмитиновых ТГ в одноименных ЛПОНП; это печеночная ГЛГ и кофактор апоС-III. При действии же неоптимальной липазы при электрофорезе ЛПНП формируется ГЛП типа IIb. Если экзогенной пальмитиновой НЖК становится много, как при плотоядном питании, афизиологичная, отрабатанная на ступенях филогенеза индукция субстратом подключает хиломикроны для переноса НЖК от энтероцитов к гепатоцитам, формируя к крови ГЛП типа V (вариант III).

Атеросклероз и атероматоз – прообразы физиологичных процессов *in vivo*, нарушения двух разных биологических функций. У всех особей в любом возрасте нарушение биологической функции трофологии, заложенной на ступенях филогенеза, потребление мясной пищи выше оптимального физиологичного уровня является первопричиной повышения в плазме крови содержания вначале ТГ (спирта глицерина). Далее следует повышение уровня пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП, ХС-ЛПНП и формирование синдрома ИР

[25]. Это первые симптомы метаболической пандемии, которую мы именуем атеросклерозом.

Атеросклероз формируют:

- нарушение физико-химических параметров экзогенных и эндогенных ЖК, отношения МЖК/НЖК; изменения физико-химических свойств ТГ - субстратов для ферментов гидролиза (липолиза) в кишечнике, плазме крови и цитоплазме клеток; выраженные физико-химические различия позиционных изоформ пальмитиновых и олеиновых ТГ;

- формирование в крови безлигандных, пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП и зависимое от количества пальмитиновых ЛПОНП [26] формирование на ступенях филогенеза типов ГЛП. Это происходит в афизиологичной последовательности в онтогенезе травоядных: нет ГЛП→ГЛП типа IV→ГЛП типа IIb и ГЛП типа V. Последний тип ГЛП указывает на то, что питание пациента близко к плотоядному;

- блокада поглощения клетками эссенциальных ПНЖК, нарушение синтеза биологически активных эйкозаноидов, включая простагландины, простациклины, тромбоксаны, лейкотриены, активация компенсаторного синтеза афизиологичных медиаторов из эндогенно синтезированных не ПНЖК, а только из ННЖК;

- нарушение функции интегральных протеинов плазматической мембраны клеток, включая ионные помпы, ионные моно- и дипортеры, рецепторы, мембранные транслоказы и изменение физико-химических свойств гидрофобных кластеров плазматической мембраны – рафтов (плотов) в клетках по причине нарушения синтеза менее гидрофобных, заряженных аминокислотных липидов. Не забудем, что аминокислотные липиды формируют в плазматической мембране для каждого интегрального белка менее гидрофобное окружение в выраженной гидрофобной плазматической мембране из фосфатидилхолинов;

- выраженные нарушения *in vivo* адгезии клеток, включая агрегацию тромбоцитов, формирование тромбообразования в артериях мышечного типа и нарушения эндотелийзависимой вазодилатации в раннем филогенезе, дистальном отделе артериального русла.

Если атеросклероз - это следствие нарушения биологической функции трофологии, атероматоз в свою очередь - это а) компенсаторная реакция на формирование атеросклероза и б) реализация биологической функции эндозеологии – поддержание «чистоты» межклеточной среды *in vivo* [27]. Атеросклероз и атероматоз - два разных афизиологичных процесса с разными факторами этиологии и разным патогенезом; это нарушение *in vivo* двух разных биологических функций. Согласно предложенной нами филогенетической теории общей патологии, атеросклероз является нарушением биологической функции трофологии, функции питания, биологической реакцией экзотрофии. Атеросклероз индуцирован неоптимальным для *Homo sapiens* субстратом – плотоядной (мясной) пищей, далее *in vivo* следует формирование пальмитинового, физиологичного, раннего в филогенезе, менее эффективного варианта метаболизма *in vivo* ЖК взамен более позднего на ступенях филогенеза высокоэффективного олеинового варианта метаболизма ЖК.

В реализации биологической функции эндозеологии атероматоз становится процессом, к сожалению, патологической компенсации. Атероматоз призван устранить все последствия нарушения переноса ЖК при афизиологичной индукции субстратом (пальмитиновыми ТГ) а) в структуре ЛПОНП; б) в апоЕ/В-100-рецепторном эндцитозе; в) в функции ЛПНП и г) в апоВ-100-эндцитозе их клетками *in vivo*.

При атероматозе последовательно происходит следующее:

- физиологичная денатурация безлигандных, пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП в крови циркулирующими нейтрофилами путем активации перекисного окисления апоВ-100 активными формами кислорода в физико-химической реак-

ции «респираторного взрыва». Количество образованных активных форм кислорода определено индукцией субстратом - числом циркулирующих в крови безлигандных, пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП и типом ГЛП [28]. Перекисное окисление липидов – это побочная реакция; суть физиологической денатурации - физико-химические реакции окисления - состоит в формировании в апоВ-100 антигенных эпитопов, денатурации апо;

– наличие антигенных эпитопов на поверхности физиологично денатурированных пальмитиновых ЛПОНП→ЛПНП распознают толл-подобные рецепторы-4 на мембране иммунокомпетентных клеток. Они формируют иммунную, функциональную метку – «подлежит удалению»; одновременно происходит активация иммунной системы компонентов комплемента [29];

· за функцией системы компонентов комплемента следует опсонизация пальмитиновых ЛПНП, перенос их через монослой эндотелия. Его активирует биологическая реакция транцитоза за счет активации функции эндотелийзависимой вазодилатации и локального повышения в дистальном отделе артериального русла гидродинамического давления. Выведение эндогенно синтезированных, физиологично денатурированных ЛП в интиму артерий, как и всех иных флогогенов большой мол. массы, происходит в позднем в филогенезе проксимальном отделе артериального русла, артериях эластического типа;

· на поздних ступенях филогенеза при замыкании системы кровообращения интима стала местом сбора и утилизации больших эндогенных флогогенов из внутрисосудистого, локального пула межклеточной среды. Чтобы перенесенные транцитозом флогогены не вышли обратно в кровоток, их связывают протеогликановые компоненты матрикса интимы;

· физиологично утилизацию всех флогогенов в интиму реализуют мультифункциональные, филогенетически ранние оседлые макрофаги [30]. Эти клетки утилизируют эндогенные флогогены полностью, используя для этого биологическую функцию эндоэкологии, биологическую реакцию воспаления. На этом, казалось бы, физиологичная утилизация афизиологичных ЛПОНП→ЛПНП заканчивается. Однако суть всегда скрыта в деталях.

При соблюдении травоядным видом *Homo sapiens* филогенетически обоснованной пищи при метаболизме липидов в принципе пальмитиновые ТГ и пальмитиновые ЛПОНП практически не образуются [31]. Малое их количество оседлые макрофаги интимы утилизируют полностью. Ранние в филогенезе мультифункциональные макрофаги лишены способности пролиферировать. В условиях формирования большого количества пальмитиновых ЛПОНП возможностей оседлых макрофагов оказывается явно недостаточно. Недостаток компенсирует функция моноцитов→макрофагов гематогенного происхождения. Однако они являются менее полифункциональными; они не могут гидролизовать все ПНЖК, этерифицированные спиртом ХС в форму поли-ЭХС. Это подтверждено тем, что основу атероматозных масс в плотных бляшках интимы артерий составляют частично катаболизированные (укороченные, С18) ПНЖК, этерифицированные спиртом ХС, поли-ЭХС.

Атеросклероз и атероматоз – это биологические реакции компенсации, реализация биологической функции адаптации. Они инициированы индукцией афизиологичным субстратом, когда травоядный в филогенезе *Homo sapiens* начинает в афизиологично большом количестве поедать мясо, становится порой совсем плотоядным [32]. Атеросклероз – результат формирования *in vivo* физиологичного, но более раннего в филогенезе варианта переноса ЖК в форме ТГ в составе апоВ-100 ЛПНП. Он индуцирован афизиологичным избытком плотоядной пищи; атероматоз – филогенетическая компенсация этого процесса, реализованная *in vivo*, к сожалению, не в физиологичном исполнении.

Какое количество пальмитиновой НЖК в пище и in vivo можно считать физиологичным? Позиционные изоформы пальмитиновых и олеиновых ТГ. Противоположные сдвиги в переносе ЖК на ступенях филогенеза и в онтогенезе при поедании травоядными мяса, повышение ХС-ЛПНП являются отражением компенсаторной, физиологичной реакции *in vivo* в ответ на нарушение индукции субстратом [33]. Важно в первую очередь понять, а далее оценивать количество пальмитиновой НЖК, которое инсулинозависимые ЛПОНП + апоЕ/В-100-эндцитоз могут перенести к клеткам, а инсулинзависимые клетки поглотить в составе олеиновых ЛПОНП без образования пальмитиновых ТГ, пальмитиновых ЛПОНП и повышения ХС-ЛПНП. Для этого мы предлагаем рассмотреть спектр в плазме крови позиционных изоформ пальмитиновых и олеиновых ТГ, оценить региоспецифичный состав ТГ [34].

Особенность всех внеклеточных липаз *in vivo* (панкреатическая липаза, печеночная ГЛГ и постгепариновая ЛПЛ) состоит в том, что они в кровотоке в составе ТГ гидролизуют одну (максимально две) ЖК в sn-1 и sn-3 и эфирные связи ЖК только с первичными спиртовыми группами глицерина. Одновременно липазы не могут гидролизовать эфирную связь ЖК с вторичной спиртовой группой в sn-2. Поэтому из sn-2 клетки поглощают ЖК не как полярную неэтерифицированную ЖК (НЭЖК), а только в форме 2-моноацилглицерида. В отличие от ЖК в sn-1 и sn-3 ЖК из sn-2 обязательно будет поглощена клетками. В зависимости от того, какая ЖК этерифицирована глицерином в sn-2, мы делим все ТГ на пальмитиновые, олеиновые и линолевые, содержание которых в плазме крови является большим. Выраженное различие стериических, пространственных форм ТГ, мы полагаем, является основой того, что апоВ-100 избирательно структурирует их в ЛПОНП, формируя раздельно пальмитиновые, олеиновые и линолевые ЛПОНП.

Если расставить все пальмитиновые и олеиновые позиционные изоформы ТГ в порядке возрастания скорости их гидролиза при действии липаз, образуется последовательность:

ППП - ППО - ОПП - ОПО - ПОП - ПОО - ООП - ООО.

Эти восемь позиционных изоформ ТГ доминируют среди общего числа 40 - 45 изоформ ТГ в апоВ-100 ЛП в плазме крови здоровых добровольцев. С наиболее высокой константой скорости реакции липазы *in vivo* гидролизуют позиционные изоформы ТГ как олеил-олеил-олеат глицерол (ООО). ТГ как пальмитоил-пальмитат глицерол (ППП) липазы не гидролизуют вообще. Пальмитиновыми ТГ являются ППП – ППО – ОПП – ОПО, олеиновыми – соответственно ПОП – ПОО – ООП – ООО. Все олеиновые ТГ гепатоциты структурирует в состав олеиновых ЛПОНП; клетки поглощают сформировавшие лиганд олеиновые ЛПОНП путем апоЕ/В-100-эндцитоза; олеиновые ЛПНП при этом не образуются. Параметры гидролиза индивидуальных олеиновых ТГ, естественно, различаются [35]: акцептором НЭЖК в реакции липолиза является белок альбумин. Постгепариновая ЛПЛ обладает позиционной специфичностью и гидролизует в первую очередь ЖК в sn-1.

У травоядных, у вида *Homo sapiens* физиологичным, мы считаем, является то количество пальмитиновой НЖК, которое возможно этерифицировать в состав олеиновых ТГ и структурировать в олеиновые ЛПОНП. С наименьшей скоростью реакции постгепариновая ЛПЛ гидролизует олеиновые позиционные изоформы ТГ как пальмитоил-олеил-пальмитат (ПОП) глицерол. В составе ПОП в олеиновые ТГ этерифицировано в 2 раза больше пальмитиновой НЖК, чем в иные изоформы олеиновых ТГ как пальмитоил-олеил-олеат (ППО) и олеил-олеил-пальмитат глицерол (ООП).

В биохимических реакциях при гидролизе эфиров (ТГ) *in vivo* в составе ЛП; при поглощении ЖК митохондриями и окислении в матриксе в цикле Кребса и в дыхательной це-

пи олеиновая МЖК в несколько раз активнее пальмитиновой НЖК. Однако в физико-химических реакциях более гидрофобная пальмитиновая НЖК с температурой плавления почти в 5 раз выше, чем олеиновая МЖК (13,5 и 63,1°C), является более активной (см. таблицу). Если при нарушении функции инсулина, синдроме ИР гепатоциты из экзогенной глюкозы синтезируют не олеиновую МЖК, а только пальмитиновую НЖК, происходит формирование пальмитиновых ТГ с этерификацией пальмитиновой НЖК в sn-2 спирта глицерина. Далее 2-глицеропальмитат в гепатоцитах этерифицирует в пальмитиновые ТГ олеиновую МЖК в позициях sn-1 и sn-3. Мы полагаем, что в формировании типов ГЛП у пациентов с патологией сердечно-сосудистой системы основная патогенетическая роль принадлежит нарушению регуляторной активности инсулина и синтезу гепатоцитами из экзогенной глюкозы эндогенной пальмитиновой НЖК; афизиологичной индукции субстратом у травоядных, избыточному количеству в плотоядной (мясной пище) пище экзогенной пальмитиновой НЖК.

Первым условием физиологичного переноса к клеткам пальмитиновой НЖК в составе олеиновых ТГ является преимущественный синтез в гепатоцитах *de novo* олеиновой МЖК из экзогенной глюкозы при действии инсулина. Только эндогенно синтезированную олеиновую МЖК гепатоциты этерифицируют с трехатомным спиртом глицерином в sn-2 со вторичной спиртовой группой. Эти же гепатоциты этерифицируют пальмитиновую НЖК в sn-1 и sn-3 с первичными спиртовыми группами [36]. Можно полагать, что индукция субстратом – пальмитиновой НЖК (эндогенной в первую очередь и экзогенной – во вторую) и является причиной доминирования среди позиционных форм олеиновых ТГ как ПОП. Вероятно, в такой, не столь часто повторяющейся ситуации у пациентов формируется ГЛП типа IV, если в физиологичных олеиновых ТГ преобладает позиционная изоформа как ПОП. В экспериментах показано, что при этерификации НЖК в sn-2 глицерина энтероциты всасывают гидролизированные ТГ более активно, и длительность постпрандиальной ги-

перлипидемии меньше, чем при всасывании олеиновых ТГ [37].

Если поступление с пищей экзогенной пальмитиновой НЖК превышает количество олеиновой МЖК, этерифицировать олеиновую МЖК первой в олеиновые ТГ возможности нет. При этом происходит этерификация пальмитиновой НЖК в sn-2 и синтез пальмитиновых ТГ. В гепатоцитах апоВ-100 структурирует олеиновые ТГ в состав уже пальмитиновых ЛПОНП; в кровотоке их к клеткам переносят уже не олеиновые, а пальмитиновые ЛПОНП [38]. В то же время пальмитиновые ТГ – это не оптимальный субстрат для гидролиза постгепариновой ЛПЛ, поэтому пальмитиновые ЛПОНП не формируют апоЕ/В-100-лиганд, оставаясь безлигандными [39]. В крови они медленно превращаются в пальмитиновые ЛПОНП→ЛПНП. Именно они формируют в кровотоке афизиологичные, малые, с высокой плотностью пальмитиновые ЛПНП [40]; при физиологичной, травоядной пище этих ЛП в крови человека не бывает. С этого, мы полагаем, начинается процесс повышения в плазме крови ХС-ЛПНП. Далее электрофорез ЛП выявляет не столь частое формирование в плазме крови ГЛП типа IV, и позже гораздо чаще ГЛП типа IIb доминирует среди всех афизиологичных типов ГЛП. Одновременно все это сопровождается компенсаторное повышение активности печеночной ГЛГ и повышение содержания апоС-III, для которых пальмитиновые ЛПОНП являются оптимальным субстратом.

Реальность формирования *in vivo* преимущественно позиционных изоформ ТГ как ПОП демонстрируют позиционные формы ТГ в пальмовом масле. Как и все растительные масла, пальмовое масло – олеиновое, в нем преобладают олеиновые ТГ и в sn-2 ТГ этерифицирована олеиновая МЖК, а в sn-1 и sn-3 доминирует пальмитиновая НЖК. Однако если дальнейшие пути ЖК из sn-2 можно заранее предсказать (ее обязательно поглотят энтероциты), будущее пальмитиновой НЖК в sn-1 и sn-3 предсказать труднее. Скармливая экспериментальным животным пальмовое масло, мы вводим *in vivo* в 2 раза большее количество пальмитиновой НЖК по сравнению с иным маслом, однако содержание ХС в плазме крови повышается лишь на четверть. Это определено тем, что в тонкой кишке гидролизованная из sn-1 и sn-3 пальмитиновая НЖК в форме НЭЖК реагирует с ионами кальция и магния, образуя кальциевые и магниевые мыла. В водной среде они не являются нерастворимыми, и энтероциты всасывать их не могут; утилизирует мыла микробиота толстой кишки. Одновременно олеат кальция и олеат магния в гидрофильной среде кишечного содержимого остаются растворимыми и их полностью всасывают энтероциты.

Биологические, филогенетические основы профилактики атеросклероза и атероматоза. Если на основании приведенной выше последовательности позиционных изоформ ТГ пищу пациента можно охарактеризовать как «сдвиг вправо», профилактика двух сочетанных патологических процессов - атеросклероза и атероматоза - будет успешной. Чем в большей мере реализация биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии будет соответствовать сдвигу влево, тем выше риск становления атеросклероза и атероматоза, меньше время до развития симптомов ишемической болезни, поражения атероматозом коронарных артерий, инцидентов острой коронарной недостаточности и инфаркта миокарда [41].

Экзогенным фактором инициирования ГЛП наиболее часто является плотоядная, мясная пища, богатая пальмитиновой НЖК; самой афизиологичной пищей для травоядного вида *Homo sapiens* является говядина. Содержание в ней пальмитиновой НЖК, одноименных ТГ наиболее высоко в сравнении со всеми видами мяса: свининой, бараниной, кониной, мясом птицы. В sn-2 ТГ говядины наиболее часто этерифицирована пальмитиновая НЖК, в меньшей

Физико-химические свойства ЖК

Формула	ЖК	Температура плавления, С°
C12:0	Лауриновая	44,2
C14:0	Миристиновая	53,9
C16:0	Пальмитиновая	63,1
C17:0	Маргариновая	61,3
C18:0	Стеариновая	69,6
C20:0	Арахидиновая	76,5
C22:0	Бегеновая	81,5
C24:0	Лигноцериновая	86,0
C16:1 ω-9	Пальмитолеиновая	-0,5
C18:1 ω-9 цис-	Олеиновая	13,5
C18:1 ω-9 транс-	Элаидиновая	44,5
C18:1 ω-7	Вакценовая	44,0
C24:1 ω-9	Нервоновая	42,5
C18:2 ω-6	Линолевая	-5,0
C18:3 ω-3	Линоленовая	-10,0
C20:4 ω-6	Арахидононовая	-49,5
C22:5 ω-3	Клупанононовая	-45,0
C22:6 ω-3	Докозагексаеновая	-44,1

Примечание. АД – артериальное давление; * – $p < 0,05$.

мере - олеиновая МЖК; в sn-1 и sn-3 наиболее часто располагается пальмитиновая ЖК [42]. То же можно сказать о коровьем молоке, сливках, сметане, сырах; в них в sn-2 ТГ всегда этерифицирована пальмитиновая НЖК. Уже в энтероцитах, а затем в гепатоцитах при реакции изомеризации пальмитиновую НЖК в sn-2 замещает олеиновая МЖК, а пальмитиновая НЖК перемещается в sn-3, формируя нежелательные для липолиза позиционные изоформы олеиновых ТГ как ПОП; это явно не физиологичный субстрат для постгепариновой ЛПЛ.

Изложенное способствует пониманию того, что если исключить врожденные, генетически обусловленные формы патологии, формирование *in vivo* двух афизиологичных процессов - вначале атеросклероза и затем атероматоза - является следствием нарушения биологической функции трофологии (питания), биологической реакции экзотрофии, внешнего питания. В формировании типов ГЛП основную патогенетическую роль исполняют нарушение функции инсулина и афизиологичная индукция субстратом - поедание филогенетически травоядным видом *Homo sapiens* избыточного количества мясной пищи. В афизиологичном исполнении всех биохимических реакций повинны только количественные нарушения индукции субстратом [43].

Для объективной оценки того, что пациент, несмотря на возможные рассказы об аскетичном питании, злоупотребляет мясной пищей, можно использовать тесты на содержание в сыворотке крови ТГ, общего ХС и ХС-ЛПНП. Более специфичными можно считать определение типов ГЛП при электрофорезе ЛП, компенсаторное, специфичное увеличение в крови апоС-III и апоВ-48. Количественное определение апоВ-48 дает возможность установить, являются ли оставшиеся в электрическом поле при электрофорезе на старте действительно ХМ или это физико-химические агрегаты пальмитиновых и олеиновых ЛПОНП.

Согласно номенклатурным данным, коровье масло ласково именуют сливочным маслом; на самом деле это животный, пальмитиновый, насыщенный, молочный жир с высокоэффективным усвоением, высокой биодоступностью. ТГ «конечных липидов» в молоке синтезированы так, что всю пальмитиновую НЖК, этерифицированную в sn-2 пальмитиновых ТГ, и олеиновую МЖК - в sn-1 и sn-3 ТГ, обязательно поглотят все соматические клетки путем апоВ-100-эндоцитоза в составе пальмитиновых ЛПНП путем апоВ-100-рецепторного эндоцитоза. Эти особенности имеют большое биологическое, физиологичное значение для новорожденных в течение первых месяцев жизни, когда материнское молоко является единственной пищей.

Биология не давала согласия на превращение млекопитающего *Homo sapiens* в млекопитающегося, который питается молоком всю жизнь. Общей биологией это не предусмотрено. Во всех диетах биологически оправдана замена в пище животного, насыщенного пальмитинового жира, именуемого сливочным маслом, на пальмовое, олеиновое масло растительного происхождения. На ступенях филогенеза вид *Homo sapiens* последовательно сформировался как рыбоядный, травоядный (плодоядный), но никак не мясоед [44]. В течение всей жизни, особенно в пожилом возрасте, надо помнить, что человек исторически травояден; избыточное количество животной пищи, особенно говядины, является основной причиной становления ГЛП разных типов в филогенетической и онтогенетической последовательности. Гиперлипидемия, гипергликемия, гиперинсулинемия и синдром ИР формируются как следствие и реакции компенсации в результате афизиологичного поедания мясной пищи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-6, 8-10, 13, 15-24, 26-28, 31-39, 42-44 см. REFERENCES)

7. Титов В.Н. *Клиническая биохимия. Курс лекций*. М.: ИНФРА-М; 2017.
11. Юнусова С.Г., Розенталь А.Н., Балтина Т.В. Стресс. Биологический и психологический аспекты. *Ученые записи Казанского государственного университета*. 2008; 150(3): 139 – 50.
12. Покровский В.М., Коротко Г.Ф. *Физиология человека*. М.: «Медицина»; 2007.
14. Титов В.Н. *Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов*. М.- Тверь: ООО «Издательство Триада»; 2008.
25. Ткачук В.А., Воронников А.В. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину. *Сахарный диабет*. 2014; 2: 29 – 40.
29. Берлов М.Н., Умнякова Е.С., Кокряков В.Н. Белки пептиды нейтрофилов в регуляции системы комплемента. *Патогенез*. 2017; 15(1): 29 – 33.
30. Вей Ю.Т., Ксиа Д.Ш., Янг В., Вонг К.Г., Донг Н.Г. Секреторная активность адипоцитов и макрофагов при воспалении и/или резистентности к инсулину и эффекты адипоцитов на преадипоциты в тех же условиях. *Биохимия*. 2014; 79(7): 834 – 44.
40. Никитин Ю.П. Новые фундаментальные и прикладные основы атерогенеза. *Бюллетень СО РАМН*. 2006; 2(120): 6 – 14.
41. Титов В.Н. Биологическая функция трофологии (питания) и патогенез метаболического синдрома – физиологичного переедания. Филогенетическая теория общей патологии, лептин и адипонектин. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 2: 68 – 79.

REFERENCES

1. Soto A.M., Longo G., Montévil M., Sonnenschein C.. The biological default state of cell proliferation with variation and motility, a fundamental principle for a theory of organisms. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2016; 122(1): 16 - 23.
2. Vafeiadou K., Weech M., Sharma V., Yaqoob P., Todd S., Williams C.M., Jackson K.G., Lovegrove J.A. A review of the evidence for the effects of total dietary fat, saturated, monounsaturated and n-6 polyunsaturated fatty acids on vascular function, endothelial progenitor cells and microparticles. *Br. J. Nutr.* 2012; 107(3): 303 - 24.
3. Orekhov A.N., Ivanova E.A. Cellular models of atherosclerosis and their implication for testing natural substances with anti-atherosclerotic potential. *Phytomedicine*. 2016; 23(11): 1190 - 7.
4. Longo G., Montévil M., Sonnenschein C., Soto A.M. In search of principles for a Theory of Organisms. *J. Biosci.* 2015; 40(5): 955 - 68.
5. Sirota J.C., McFann K., Targher G., Johnson R.J., Chonchol M., Jalal D.I. Elevated serum uric acid levels are associated with non-alcoholic fatty liver disease independently of metabolic syndrome features in the United States: liver ultrasound data from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Metabolism*. 2013; 62(3): 392 - 9.
6. Pereira S., Park E., Moore J., Faubert B., Breen D.M. Resveratrol prevents insulin resistance caused by short-term elevation of free fatty acids in vivo. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2015; 40(11): 1129 - 36.
7. Titov V.N. *Clinical biochemistry. Lecture course. [Klinicheskaya biokhimiya. Kurs lektsiy]*. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
8. Boeing H., Bechthold A., Bub A., Ellinger S., Haller D., Kroke A. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *Eur. J. Nutr.* 2012; 51(6): 637 -63.
9. Wells J.C.K. Body composition and susceptibility to type 2 diabetes: an evolutionary perspective. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2017; 71: 881 – 9.
10. Keane K.N., Calton E.K., Carlessi R., Hart P.H., Newsholme P. The bioenergetics of inflammation: insights into obesity and type 2 diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2017; 71(7): 904 - 12.
11. Yunusova S.G., Rozental' A.N., Baltina T.V. Stress. Biological and psychological aspects. *Uchenye zapisi Kazanskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2008; 150(3): 139 – 50. (in Russian)
12. Pokrovskiy V.M., Korotko G.F. *Human physiology. [Fiziologiya cheloveka]*. Moscow: Meditsina; 2007. (in Russian)
13. Miller P.E., Martin S.S., Toth P.P., Santos R.D., Blaha M.J., Nasir K. Screening and advanced lipid phenotyping in familial hypercholesterolemia: the very large database of lipids study-17 (VLDL-17). *J. Clin. Lipidol.* 2015; 9(5): 676 - 83.

14. Titov V.N. *Clinical biochemistry of fatty acids, lipids and lipoproteins. [Klinicheskaya biokhimiya zhirnykh kislot, lipidov i lipoproteinov]*. Moscow- Tver': OOO «Izdatel'stvo «Triada»; 2008. (in Russian)
15. Nakano T., Tanaka A., Okazaki M., Tokita Y., Nagamine T., Nakajima K. Particle size of apoB-48 carrying lipoproteins in remnant lipoproteins isolated from postprandial plasma. *Ann. Clin. Biochem.* 2011; 48(Pt 1): 57 - 64.
16. Julve J., Martín-Campos J.M., Escolà-Gil J.C., Blanco-Vaca F. Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics. *Clin. Chim. Acta.* 2016; 455: 134 - 48.
17. Morino K., Petersen K.F., Shulman G.I. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes.* 2006; 55 Suppl 2: S9 - S15.
18. Gutierrez-Juarez R., Pocai A., Mulas C., Ono H., Bhanot S., Monia B.P., Rossetti L. Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(6): 1686 -95.
19. Bednarski T., Olichwier A., Opasinska A., Pyrkowska A., Gan A.M., Ntambi J.M., Dobrzyn P. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency reduces lipid accumulation in the heart by activating lipolysis independently of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1861(12 Pt A): 2029 - 37.
20. Irawati D., Mamo J.C., Slivkoff-Clark K.M., Soares M.J., James A.P. Dietary fat and physiological determinants of plasma chylomicron remnant homeostasis in normolipidaemic subjects: insight into atherogenic risk. *Br. J. Nutr.* 2017; 117(3): 403 - 12.
21. Nakajima K., Nakano T., Moon H.D., Nagamine T., Stanhope K.L., Havel P.J., Warnick G.R. The correlation between TG vs remnant lipoproteins in the fasting and postprandial plasma of 23 volunteers. *Clin. Chim. Acta.* 2009; 404(2): 124 - 7.
22. Hassing H.C., Surendran R.P., Mooij H.L., Stroes E.S., Nieuwdorp M., Dallinga-Thie G.M. Pathophysiology of hypertriglyceridemia. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1821(5): 826 - 32.
23. Morita S.Y. Metabolism and Modification of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins Involved in Dyslipidemia and Atherosclerosis. *Biol. Pharm. Bull.* 2016; 39(1): 1 - 24.
24. di Filippo M., Marçais C., Charrière S., Marmontel O., Broyer M., Delay M., Post-heparin LPL activity measurement using VLDL as a substrate: a new robust method for routine assessment of plasma triglyceride lipolysis defects. *PLoS One.* 2014; 9(6): e99721.
25. Tkachuk V.A., Vorotnikov A.V. Molecular mechanisms of development of insulin resistance. *Sakharnyi diabet.* 2014; 2: 29 - 40. (in Russian)
26. Ivanova E.A., Muasodova V.A., Melnichenko A.A., Grechko A.V., Orekhov A.N. Small dense low-density lipoprotein as biomarker for atherosclerotic diseases. *Oxidat. Med. Cell. Long.* 2017; 2017:1273042.
27. Norata G.D., Raselli S., Grigore L., Garlaschelli K., Vianello D., Bertocco S. Small dense LDL and VLDL predict common carotid artery IMT and elicit an inflammatory response in peripheral blood mononuclear and endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2009; 206(2): 556 - 62.
28. Agarwal A., Majzoub A. Laboratory tests for oxidative stress. *Indian. J. Urol.* 2017; 33(3): 199 - 206.
29. Berlov M.N., Umnyakova E.S., Kokryakov V.N. Proteins of neutrophil peptides in the regulation of the complement system. *Patogenez.* 2017; 15(1): 29 - 33. (in Russian)
30. Bey Yu.T., Ksia D.Sh., Yang V., Vong K.G., Dong N.G. Secretory activity of adipocytes and macrophages with inflammation and / or insulin resistance and the effects of adipocytes on preadipocytes under the same conditions. *Biokhimiya.* 2014; 79(7): 834 - 44. (in Russian)
31. Cohen J.C. Emerging LDL therapies: Using human genetics to discover new therapeutic targets for plasma lipids. *J. Clin. Lipidol.* 2013; 7(3 Suppl): S1 - 5.
32. Stroes E., Moulin P., Parhofer K.G., Rebours V., Löhr J.M., Aversa M. Diagnostic algorithm for familial chylomicronemia syndrome. *Atheroscler. Suppl.* 2017; 23: 1 - 7.
33. Han S., Liang C.P., Westerterp M., Senokuchi T., Welch C.L., Wang Q. Hepatic insulin signaling regulates VLDL secretion and atherogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* 2009; 119(4): 1029 - 41.
34. Ando Y., Tomita Y., Haba Y. Preparation of ethyl magnesium bromide for regiospecific analysis of triacylglycerols. *J. Oleo. Sci.* 2008; 57(8): 459 - 62.
35. Ruiz-Lopes N., Stubhaug I., Ipharraguerre I., Rimbach G., Menoyo D. Positional Distribution of Fatty Acids in Triacylglycerols and Phospholipids from Fillets of Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Fed Vegetable and Fish Oil Blends. *Mar. Drugs.* 2015; 13(7): 2455 - 69.
36. Lopes T.I., Ribeiro M.D., Ming C.C., Grimaldi R., Gonçalves L.A., Marsaioli A.J. Comparison of the regiospecific distribution from triacylglycerols after chemical and enzymatic interesterification of high oleic sunflower oil and fully hydrogenated high oleic sunflower oil blend by carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Food. Chem.* 2016; 212: 641 -7.
37. Wang T., Wang X., Wang X. Effects of Lipid Structure Changed by Interesterification on Melting Property and Lipemia. *Lipids.* 2016; 51(10): 1115 - 26.
38. Gouk S.W., Cheng S.F., Ong A.S., Chuah C.H. Stearic acids at sn-1, 3 positions of TAG are more efficient at limiting fat deposition than palmitic and oleic acids in C57BL/6 mice. *Br. J. Nutr.* 2014; 111(7): 1174 - 80.
39. Lewis G.F., Xiao C., Hegele R.A. Hypertriglyceridemia in the genomic era: a new paradigm. *Endocr. Rev.* 2015; 36(1): 131 - 47.
40. Nikitin Yu.P. New fundamental and applied fundamentals of atherogenesis. *Bulleten' SO RAMN.* 2006; 2(120): 6 - 14. (in Russian)
41. Titov V.N. Biological function of trophology (nutrition) and pathogenesis of metabolic syndrome - physiological overeating. Phylogenetic theory of general pathology, leptin and adiponectin. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2014; 2: 68-79. (in Russian)
42. Ghaffar S., Afridi S.K., Aftab M.F., Murtaza M., Syed S.A., Begum S., Waraich R.S. Attenuation of palmitate induced insulin resistance in muscle cells by harmala, clove and river red gum. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2016; 29(5 Suppl): 1795 - 1800.
43. Sun Y., Neelakantan N., Wu Y., Lote-Oke R., Pan A., van Dam R.M. Palm Oil Consumption Increases LDL Cholesterol Compared with Vegetable Oils Low in Saturated Fat in a Meta-Analysis of Clinical Trials. *J. Nutr.* 2015; 145(7): 1549 - 58.
44. Harvey K.A., Walker C.L., Xu Z., Whitley P, Pavlina TM, Hise M. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *J. Lipid. Res.* 2010; 51(12): 3470-80.

Поступила 01.09.17
Принята к печати 10.10.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.153.455.01-008.9-074

Гильмиярова Ф.Н., Гусякова О.А., Балдина О.А., Ерещенко А.А., Меженкова И.А., Арчибасова О.В., Халиулин А.В., Сосновская Л.В.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРГЛИКЕМИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ БИОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРОВИ IN VITRO

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

Цель данного исследования - выявление возможных отклонений результатов биохимического анализа крови от истинных значений в условиях гипергликемии *in vitro* и зависимости данных изменений от групповой принадлежности исследуемой крови. Нами был проведен биохимический анализ крови пациентов с разными группами крови по системе АВ0 в условиях нормо- и гипергликемии *in vitro*. Критерием выбора являлись содержание основных биохимических показателей крови (общий белок, общий билирубин, глюкоза, общий холестерин, мочевины, креатинин, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ)) в референсных пределах. Гипергликемия *in vitro* создавалась при помощи 5% раствора глюкозы и соответствовала $20,49 \pm 0,05$ и $46,37 \pm 0,63$ ммоль/л. Наиболее стабильными показателями оказались содержание общего белка и общего холестерина. Выявлено влияние повышенного уровня глюкозы на следующие аналиты: общий билирубин (+10,5%), активность АЛТ ($\pm 13,4\%$) и АСТ (+11,1%), креатинин (+51,4%). Изменения показателей до уровня $\pm 10\%$ и более имеют клиническое значение и должны учитываться врачами клинической лабораторной диагностики и врачами-клиницистами при интерпретации результатов биохимического анализа крови для оценки истинной картины состояния пациента. Обнаружены АВ0-группоспецифические особенности биохимического анализа крови в условиях гипергликемии. Гипергликемия является интерферирующим фактором при выполнении лабораторных исследований, что особенно актуально при интерпретации результатов биохимического анализа крови у пациентов отделения реанимации, людей, длительно и тяжело страдающих сахарным диабетом с его осложнением нефропатией. Кроме того, выявленные группоспецифические особенности влияния гипергликемии на результаты биохимического исследования крови можно будет учитывать при разработке стандартов и рекомендаций персонализированной медицины.

Ключевые слова: интерференция; гипергликемия; биохимический анализ крови; постаналитический этап лабораторного исследования; группа крови АВ0; персонализированная медицина; сахарный диабет.

Для цитирования: Гильмиярова Ф.Н., Гусякова О.А., Балдина О.А., Ерещенко А.А., Меженкова И.А., Арчибасова О.В., Халиулин А.В., Сосновская Л.В. Влияние гипергликемии на показатели биохимического анализа крови *in vitro*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (4): 205-210. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-205-210>

Gilmiyarova F.N., Gusyakova O.A., Baldina O.A., Ereschenko A.A., Mezhenkova I.A., Archibasova O.V., Khaliulin A.V., Sosnovskaya L.V.

THE EFFECT OF HYPERGLYCEMIA ON INDICES OF BIOCHEMICAL BLOOD ANALYSIS IN VITRO

The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Samara State Medical University" of Minzdrav of Russia, 443099, Samara, Russia

The purpose of study was to detect possible deviations between the results of biochemical analysis of blood and true values in conditions of hyperglycemia *in vitro* and dependences of the given alterations from group belonging of analyzed blood. The biochemical analysis was applied to blood samples of patients with various blood groups according system AB0 in conditions of normo- and hyperglycemia *in vitro*. The criterion for choice was established the content of main biochemical indices of blood (total protein, total bilirubin, glucose, total cholesterol, urea, creatinine, activity of hylaninamitotransferase (ALT), aspartataminotransferase (AST), lactatedehydrogenase (LDG)) within the reference limits. The hyperglycemia was developed *in vitro* using 5% glucose solution and corresponded to $20,49 \pm 0,05$ and $46,37 \pm 0,63$ mmol/l. The content of total protein and total cholesterol turned out to be the most stable indices. The effect of increased level of glucose to following analytes was established: total bilirubin (+10,5%), ALT activity ($\pm 13,4\%$), AST activity (+11,1%) and creatinine (+51,4%). The alterations of indices up to level of $\pm 10\%$ and higher are clinically significant and have to be taking into account by physicians of clinical laboratory diagnostic and clinical physicians during interpretations of the results of biochemical analysis of blood for evaluation of true picture of condition of patient. The AB0-group specific characteristics of biochemical analysis of blood are established in conditions of hyperglycemia. The hyperglycemia is an interfering factor during implementation of laboratory analysis that is especially actual at interpretations of results of biochemical analysis of blood in patients of reanimation department and individuals suffering of persistent and severe diabetes mellitus with its complication with nephropathy. Besides, the established group-specific characteristics of hyperglycemia effecting the results of biochemical analysis of blood can be accounted in development of standards and guidelines of personified medicine.

Key words: interference; hyperglycemia; biochemical analysis of blood; post-analytical stage of laboratory analysis; blood group AB0; personified medicine; diabetes mellitus.

For citation: Gilmiyarova F.N., Gusyakova O.A., Baldina O.A., Ereschenko A.A., Mezhenkova I.A., Archibasova O.V., Khaliulin A.V., Sosnovskaya L.V. The effect of hyperglycemia on indices of biochemical blood analysis *in vitro*. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(4): 205-210. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-205-210>

For correspondence: Ereschenko A.A., the assistant of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostic of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Samara State Medical University", e-mail: bio-sam@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support

Received 07.12.2017
Accepted 12.12.2017

Введение. Глюкоза - молекула, знакомая каждому медицинскому работнику и пациенту. Она является естественным метаболитом организма человека, может быть причиной развития многих патологических состояний и заболеваний, а также служит одним из основных диагностических лабораторных критериев. Молекула глюкозы может вступать в классические ферментативные реакции и спонтанные неферментативные превращения, такие как перегруппировка Амадори, образование шиффовых оснований, гликирование, образование гликоксинов: глиоксали и метилглиоксали, нередко приводящих к развитию патологических состояний [1–3]. Гипергликемия является основным критерием наличия сахарного диабета; наиболее выраженная гипергликемия, от 20 до 40 ммоль/л, наблюдается при тяжелом течении сахарного диабета и развитии его осложнения в виде гипергликемической комы [4]. Являясь химически активным соединением, глюкоза будет в той или иной мере оказывать влияние на параметры любой биологической жидкости и её составляющих, в том числе как компонент аналитической системы лабораторного исследования. Для клинической лабораторной диагностики это достаточно важно. По данным ВОЗ, клиническая лабораторная диагностика занимает ведущее место по количеству исследований среди других методов диагностики, её доля от всех объективных методов диагностики составляет не менее 60% [5]. В связи с этим сложно переоценить влияние результатов анализа на постановку диагноза и выбор тактики лечения. При проведении лабораторного анализа и интерпретации его результатов необходимо учитывать вариации и интерференции показателя [6, 7]. Для повышения качества выполнения и интерпретации лабораторного исследования представляет интерес оценить возможность возникновения аналитической вариации, вызванной гипергликемией, и определить, характерна ли для неё индивидуальная вариабельность, ассоциированная с групповой принадлежностью крови по системе АВ0. Аналитическая вариация – это колебания содержания метаболитов, возникающие при проведении лабораторного анализа, обусловленные случайными и систематическими погрешностями, появляющимися при выполнении лабораторного анализа. Под интерференцией понимают клинически значимое смещение концентрации аналита вследствие присутствия другого компонента или специфических свойств образца. В зависимости от источника интерферента различают эндогенную и экзогенную интерференцию. Причинами экзогенной интерференции являются наличие в исследуемом образце биоматериала антисептиков, антикоагулянтов, добавленных в пробирки, химических компонентов, входящих в состав пробирок и крышек, лекарственных препаратов. К эндогенной интерференции могут привести гипербилирубинемия, гиперлипемия, гемолиз [8, 9]. Кроме того, отдельно можно выделить так называемую биологическую интерференцию, которая обусловлена индивидуальными отличиями антиген-

антительного представительства крови по системе АВ0, особенностями метаболизма, биохимического состава крови. Известно, что биологическая вариабельность метаболических и гематологических показателей ассоциируется с групповой принадлежностью крови [10–12], однако нет данных о группоспецифических особенностях реакции в условиях гипергликемии *in vitro* и связи между изменениями биохимических показателей крови и групповой принадлежностью крови пациентов.

Целью нашего исследования является выявление возможных отклонений результатов биохимического анализа крови от истинных значений в условиях гипергликемии *in vitro* и зависимости данных изменений от групповой принадлежности крови.

Материал и методы. Исследование проводилось на базе клинко-диагностической лаборатории ФГБОУ ВО «Клиники СамГМУ» Минздрава России. В лаборатории проводится более 5 000 исследований для оценки содержания глюкозы в месяц, гипергликемия выявляется в 50,5% исследований, 49% приходится на нормогликемию, 0,5% - на гипогликемию. В ходе исследования нами были использованы 80 образцов сыворотки крови с группами крови 0 (I), А (II), В (III), АВ (IV) клинически здоровых пациентов, сопоставимых по полу и возрасту. Уровень глюкозы в данных образцах составлял от 3,3 до 5,89 ($4,9 \pm 0,06$) ммоль/л. Гипергликемия *in vitro* создавалась при помощи 5% раствора глюкозы в объёмах 20 и 60 мкл и соответствовала $20,49 \pm 0,05$ ммоль/л в опыте 1 и $46,37 \pm 0,63$ ммоль/л в опыте 2, образцы инкубировались 30 мин, после чего в каждом образце определялось содержание общего белка, общего билирубина, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозы, общего холестерина, мочевины, креатинина. В качестве контрольного добавляемого раствора использовался 0,9% раствор хлорида натрия в количестве, эквивалентном добавляемому раствору глюкозы в опытных группах, и уровень глюкозы составил в контроле $1,471 \pm 0,07$ ммоль/л, в контроле 2 - $4,27 \pm 0,05$ ммоль/л. Показатели биохимического анализа крови определяли при помощи автоматического биохимического анализатора HITACHI 902 и наборов реактивов стандартизированных методик «Вектор-Бест». Анализ полученных результатов и статистический расчёт проводился при помощи программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 и Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования было установлено количественное изменение показателей биохимического анализа крови, находящейся в состоянии гипергликемии, по сравнению с контрольными образцами (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что в опыте 1 отмечается незначительное увеличение активности АЛТ, АСТ, мочевины. Содержание креатинина в среднем повысилось на 19,9% ($p < 0,001$). Практически не изменилось содержание общего белка, билирубина, холестерина, активность

Значения показателей биохимического анализа крови в условиях гипергликемии *in vitro*

Аналит	Контроль 1	Опыт 1	Дельта, абсолютная	Дельта, %	<i>p</i> Стьюдента	<i>p</i> Вилкоксона
Общий белок, г/л	69,31 ± 0,63	69,30 ± 0,67	-0,02 ± 0,33	0,0	0,961	0,473
Общий билирубин, мкмоль/л	9,41 ± 0,50	9,17 ± 0,46	-0,24 ± 0,23	-2,6	0,299	0,321
АЛТ, Ед/л	16,09 ± 0,92	18,25 ± 0,93**	2,16 ± 0,63	+13,4	0,001	< 0,001
АСТ, Ед/л	18,37 ± 0,77	20,41 ± 0,95**	2,04 ± 0,54	+11,1	< 0,001	0,001
ЛДГ, Ед/л	370,39 ± 11,15	377,20 ± 11,29	6,81 ± 3,46	+1,8	0,052	0,001
Холестерин, ммоль/л	4,86 ± 0,10	4,87 ± 0,10	0,01 ± 0,03	+0,3	0,685	0,091
Мочевина, ммоль/л	4,72 ± 0,14	5,19 ± 0,20*	0,47 ± 0,15	+9,9	0,003	0,007
Креатинин, мкмоль/л	70,27 ± 1,66	84,28 ± 1,54**	14,02 ± 1,15	+19,9%	< 0,001	< 0,001
Аналит	Контроль 2	Опыт 2	Дельта, абсолютная	Дельта, %	<i>p</i> Стьюдента	<i>p</i> Вилкоксона
Общий белок, г/л	62,84 ± 0,68	62,43 ± 0,65	-0,41 ± 0,38	-0,7	0,282	0,064
Общий билирубин, мкмоль/л	8,09 ± 0,48	8,94 ± 0,49*	0,85 ± 0,28	+10,5	0,003	0,005
АЛТ, Ед/л	16,33 ± 0,80	14,15 ± 0,80*	-2,18 ± 0,76	-13,4	0,005	0,019
АСТ, Ед/л	18,37 ± 0,93	16,79 ± 0,89	-1,58 ± 0,81	-8,6	0,015	0,011
ЛДГ, Ед/л	345,20 ± 10,13	357,09 ± 11,78	11,89 ± 7,97	+3,4	0,140	0,043
Холестерин, ммоль/л	4,43 ± 0,10	4,46 ± 0,10	0,03 ± 0,09	+0,7	0,717	0,324
Мочевина, ммоль/л	4,53 ± 0,17	4,72 ± 0,20	0,20 ± 0,22	+4,3	0,373	0,257
Креатинин, мкмоль/л	60,91 ± 1,21	92,24 ± 1,70**	31,33 ± 1,66	+51,4	< 0,001	< 0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,001$.

ЛДГ. В опыте 2 наблюдается снижение активности АЛТ (-13,4%; $p < 0,05$) и АСТ (-8,6%; $p < 0,05$), увеличение содержания общего билирубина (+10,5%; $p < 0,05$) и креатинина (+51%; $p < 0,001$) относительно контроля. Наиболее интересно в данной ситуации активирующее и ингибирующее влияние глюкозы на активность трансаминаз в зависимости от уровня гипергликемии. Принцип метода определения активности ферментов основан на измерении скорости убыли NADH, которая прямо пропорциональна активности ферментов. Возможно, повышение показателя активности ферментов вызвано действием глюкозы как окислителя, но в этой ситуации значения активности увеличивались бы соразмерно росту концентрации глюкозы, причём не только у трансаминаз, но и у ЛДГ. Поэтому, вероятнее всего, глюкоза, специфически влияя на функциональные группы активного центра фермента и взаимодействуя с аминокислотами, выступает сначала в роли активатора, а затем при значительном увеличении её концентрации - в роли ингибитора, либо действие глюкозы на показатель активности связано с одним из конечных продуктов реакции, общим для АЛТ и АСТ, - глутаматом. Глутамат в свою очередь может являться субстратом для окисления, и именно его содержание определяет окислительно-восстановительный сценарий, по которому будет действовать глюкоза. Значительное увеличение содержания креатинина обусловлено особенностью метода его определения - реакцией Яффе, при которой в щелочной среде пикриновая кислота взаимодействует с креатинином, образуя окрашенное соединение пикрат креатинина, и для этого показателя известна интерферирующая роль глюкозы [13]. Однако не была известна величина этой интерференции, которую мы и попытались определить в нашей работе. При динамике уровня глюкозы ± 20 ммоль/л наблюдается изменение показателя креатинина относительно истинных значений ± 20 –25%, что является

ся клинически значимой величиной. Безусловно, такой уровень гипергликемии наблюдается редко, однако это может иметь значение для пациентов отделения реанимации, людей, длительно и тяжело страдающих сахарным диабетом с его осложнением нефропатией. В такой ситуации даже небольшие изменения показателей могут ввести врача в заблуждение и соответственно изменить тактику и стратегию лечения.

Помимо изменений показателей биохимического анализа крови в целом следует рассмотреть разницу между опытными и контрольными образцами крови соответственно её групповой принадлежности. Так, в опыте 1 наиболее выраженное увеличение активности продемонстрировали трансаминазы в образцах группы крови В (III) и практически не изменили активность в образцах АВ (IV) (рис. 1). В опыте 2 максимальное сни-

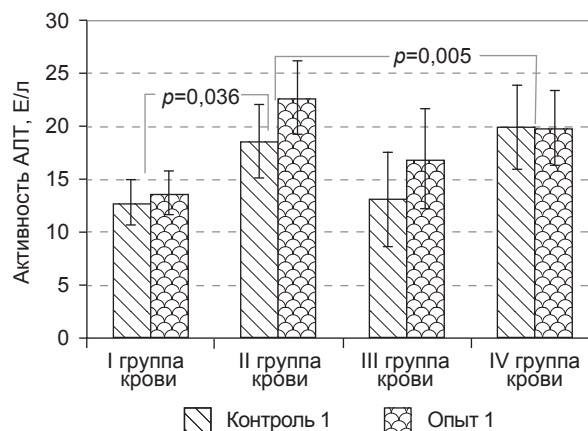


Рис. 1. Активность АЛТ в опыте 1 с учётом групповой принадлежности крови.

Таблица 2

Значения показателей биохимического анализа крови в условиях гипергликемии с учётом групповой принадлежности крови

Группа крови	Аналит	Контроль 1–опыт1		Контроль 2–опыт2	
		повышение, абсолютное $M \pm m$	повышение, %	повышение, абсолютное $M \pm m$	повышение, %
0 (I)	Общий белок	-0,37 ± 1,14	-0,5	-1,59 ± 1,15	-2,5
	Общий билирубин	-0,25 ± 0,47	-2,9	0,71 ± 0,48	10,2
	АЛТ	0,84 ± 0,40	6,6	-2,59 ± 1,18*	-19,5
	АСТ	1,63 ± 0,55*	11,7	-2,42 ± 1,25	-16,7
	ЛДГ	10,20 ± 4,08	3,0	15,50 ± 24,35	4,9
	Глюкоза	15,90 ± 0,34**	346,4	43,01 ± 1,08**	1028,6
	Холестерин	0,00 ± 0,11	0,0	0,07 ± 0,30	1,5
	Мочевина	0,22 ± 0,23	4,7	0,44 ± 0,35	11,3
	Креатинин	12,71 ± 2,55**	19,3	28,56 ± 3,25**	48,6
А (II)	Общий белок	-0,04 ± 0,57	-0,1	-0,47 ± 0,34	-0,8
	Общий билирубин	-0,62 ± 0,38	-6,3	1,07 ± 0,60	13,3
	АЛТ	4,12 ± 1,02**	22,2	-4,41 ± 1,54*	-21,4
	АСТ	3,12 ± 0,99*	14,2	-5,43 ± 2,31	-21,9
	ЛДГ	4,25 ± 1,62	1,2	2,50 ± 7,27	0,7
	Глюкоза	15,75 ± 0,14**	329,7	44,43 ± 1,05**	1027,5
	Холестерин	0,03 ± 0,03	0,7	0,00 ± 0,03	0,0
	Мочевина	0,77 ± 0,42	17,7	-0,39 ± 0,32	-8,6
	Креатинин	16,33 ± 1,61**	24,1	33,49 ± 2,30**	58,2
В (III)	Общий белок	0,64 ± 0,32	0,9	-0,19 ± 0,59	-0,3
	Общий билирубин	-0,09 ± 0,66	-1,0	0,55 ± 0,62	6,3
	АЛТ	3,78 ± 2,10	28,9	-0,82 ± 2,18	-5,5
	АСТ	2,65 ± 1,58	16,7	1,36 ± 1,16	9,2
	ЛДГ	9,95 ± 9,10	2,6	28,25 ± 16,52	8,1
	Глюкоза	15,11 ± 0,30**	323,4	37,26 ± 1,36**	861,2
	Холестерин	0,05 ± 0,06	1,0	-0,01 ± 0,16	-0,2
	Мочевина	0,73 ± 0,35	15,2	-0,71 ± 0,55	-13,6
	Креатинин	9,96 ± 2,73*	13,3	28,38 ± 5,13**	44,2
AB (IV)	Общий белок	-0,30 ± 0,25	-0,4	0,59 ± 0,71	0,9
	Общий билирубин	-0,01 ± 0,28	-0,1	1,07 ± 0,55	12,4
	АЛТ	-0,08 ± 0,49	-0,4	-0,93 ± 0,82	-5,5
	АСТ	0,75 ± 0,97	3,5	0,19 ± 1,10	1,0
	ЛДГ	2,85 ± 9,71	0,7	1,30 ± 10,54	0,3
	Глюкоза	16,37 ± 0,33**	340,1	43,68 ± 0,86**	1025,4
	Холестерин	-0,02 ± 0,06	-0,4	0,07 ± 0,09	1,4
	Мочевина	0,15 ± 0,15	3,0	1,45 ± 0,36*	32,4
	Креатинин	17,07 ± 1,94**	23,6	34,88 ± 1,41**	55,2

жение активности трансаминаз произошло в образцах групп крови А (II) и 0 (I) и практически не изменилось в пробах АВ (IV) (рис. 2).

Содержание креатинина в опытах 1 и 2 наиболее значительно повысилось у пациентов с группами крови АВ (IV) и А (II) групп. Содержание мочевины в опыте 1 умеренно повышалось в образцах всех групп крови, а в опыте 2 наблюдалось разнонаправленное отклонение результатов – повышение в образцах 0 (I) и АВ (IV) и снижение в образцах А (II) и В (III) (рис. 3).

При сравнении образцов групп крови можно гово-

рить о наиболее выраженных изменениях показателей среди проб А (II), а наименее выраженные наблюдались среди образцов АВ (IV) (табл. 2).

Самыми стабильными показателями с минимальными отклонениями в условиях гипергликемии в опытах 1 и 2 при независимости от групповой принадлежности крови оказались содержание общего холестерина и общего белка (рис. 4, 5).

Заключение. Таким образом, установлено, что в условиях гипергликемии наблюдаются количественные изменения показателей биохимического анализа крови по

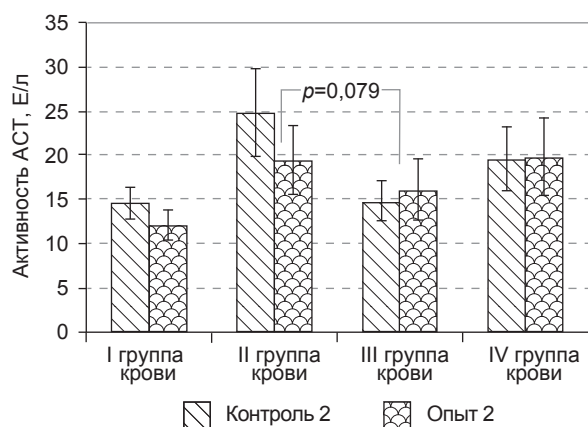


Рис. 2. Активность АСТ в опыте 2 с учётом групповой принадлежности крови.

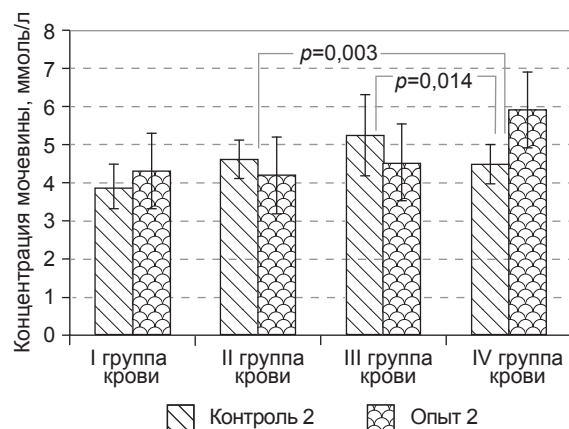


Рис. 3. Значения концентрации мочевины в опыте 2 с учётом групповой принадлежности крови.

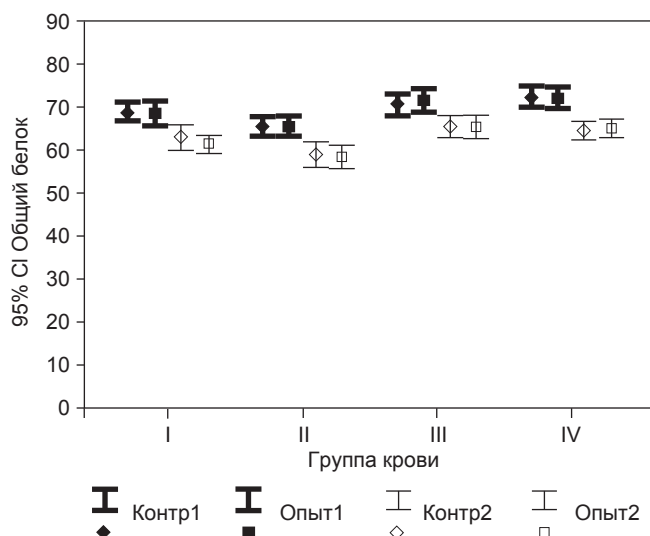


Рис. 4. Значения средней и 95% доверительный интервал для общего белка в опытах 1 и 2 в соответствии с групповой принадлежностью крови.

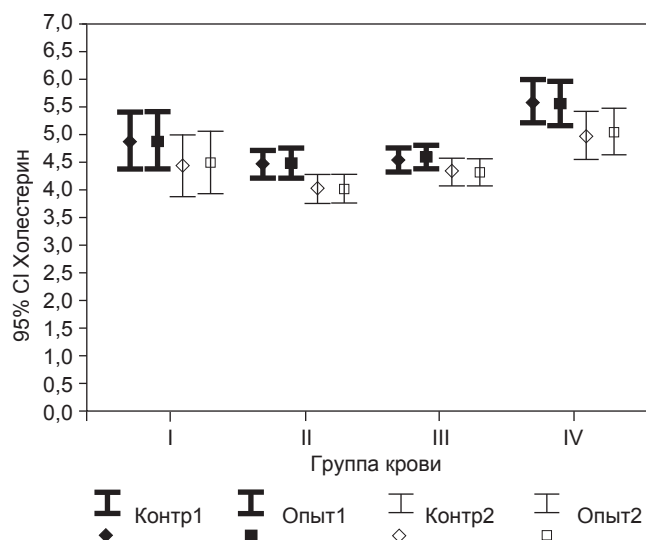


Рис. 5. Значения средней и 95% доверительный интервал для холестерина в опытах 1 и 2 в соответствии с групповой принадлежностью крови.

сравнению с контрольными образцами, где уровень глюкозы соответствует норме. При этом каждой группе крови по системе АВ0 присущи свои группоспецифические особенности. Предположительно данные изменения связаны с особенностями исследуемых анализов, которые в свою очередь ассоциируются с групповой принадлежностью крови по системе АВ0. Данный факт может являться причиной ложной интерпретации результатов, особенно при нестабильном уровне глюкозы в крови пациента. Мы разделяем точку зрения относительно того, что влияние интерферента считается достоверным, если он приводит к изменению концентрации аналита до уровня $\pm 10\%$ и более. В условиях гипергликемии такому влиянию подвержены содержание общего билирубина, креатинина, активность АЛТ и АСТ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Ланкин В.З., Тихазе А.К., Кумскова Е.М. Особенности модификации липопротеинов низкой плотности в развитии атеросклероза и сахарного диабета типа 2. *Кардиологический вестник*. 2008; 3(1): 60—7.
- Титов В.Н., Хохлова Н.В., Ширяева Ю.К. Глюкоза, гликотоксины и продукты гликирования протеинов: роль в патогенезе. *Клиническая медицина*. 2013; 3: 15-24.
- Ансари Н.А., Рашид З. Неферментное гликирование белков: от диабета до рака. *Биомедицинская химия*. 2010; 56(2): 168-78.
- Майорова Е.М., Гарипова А.Ф. Диагностика и лечение ком при сахарном диабете согласно последним рекомендациям ведения больных сахарным диабетом. *Вестник современной клинической медицины*. 2015; 8(4): 64-8.
- Кишкун А.А. *Руководство по лабораторным методам диагностики*. М.: ГЭОТАР- Медиа; 2007.
- Меньшиков В.В. Аналитическая достоверность клинической лабораторной информации и роль эталонов в её обеспечении. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 12: 52-3.
- Николаев Н.С., Назарова В.В., Добровольская Н.Ю., Пчелова Н.Н., Орлова А.В. Постаналитический этап: управление каче-

- ством клинических лабораторных исследований. *Менеджер здравоохранения*. 2016; 8: 36-45.
8. Лукичева Т.И., Меньшиков В.В. Преаналитический этап при измерении концентрации каталитической активности ферментов: особенности и задачи стандартизации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 5: 9-12.
 9. Guder W, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt Y, Toepfer G, Goerlitz H et al. The hemolytic, icteric and lipemic sample recommendations regarding their recognition and prevention of clinically relevant interferences. *J. Lab. Med.* 2000; 24: 357-64.
 10. Радомская В.М., Денисова С.Р., Бабищев А.Р. Метаболические особенности крови в связи с различной групповой принадлежностью. В кн.: *Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы последипломного образования и здравоохранения»*. Самара: СамГМУ; 2008.
 11. Гильмиева Ф.Н., Радомская В.М., Гергель Н.И., Гусякова О.А., Сидорова И.Ф., Котельников Г.П., ред. *Группы крови: биологическая вариабельность клеточного состава и метаболизма в норме и патологии*. М.: Известия; 2007.
 12. Родкина О.М. Клеточный состав крови и показатели иммунитета у ВИЧ-инфицированных 0(I)-AB(IV) групп крови. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2009; 7-8: 182-4.
 13. Gary L.M., Miller W.G., Coresh J., Fleming Ja., Greenberg N., Greene T. и др. Рекомендации по улучшению процедуры измерения сывороточного креатинина: отчет лабораторной рабочей группы национальной образовательной программы по заболеваниям. *Клинико-лабораторный консилум*. 2009; 3: 4-21.
- agement of patients with diabetes mellitus. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2015; 8(4): 64-8. (in Russian)
5. Kishkun A.A. *Guide to laboratory diagnostic methods. [Rukovodstvo po laboratornym metodam diagnostiki]*. Moscow.: GEOTAR-Media; 2007. (in Russian)
 6. Men'shikov V.V. Analytical reliability of clinical laboratory information and the role of standards in its provision. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 12: 52-3. (in Russian)
 7. Nikolaev N.S., Nazarova V.V., Dobrovol'skaya N.Yu., Pchelova N.N., Orlova A.V. Postanalytical stage: quality management of clinical laboratory studies. *Menedzher zdravookhraneniya*. 2016; 8: 36-45. (in Russian)
 8. Lukicheva T.I., Men'shikov V.V. Preanalytical stage in measuring the concentration of catalytic activity of enzymes: features and aims of standardization. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 5: 9-12. (in Russian)
 9. Guder W, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt Y, Toepfer G, Goerlitz H et al. The hemolytic, icteric and lipemic sample recommendations regarding their recognition and prevention of clinically relevant interferences. *J. Lab Med*. 2000; 24: 357-64.
 10. Radomskaya V.M., Denisova S.R., Babichev A.R. *Metabolic features of blood in connection with different group affiliation*. In: *Materials of the interregional scientific and practical conference «Actual issues of postgraduate education and health»*. Samara: Samarskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet; 2008. (in Russian)
 11. Gil'miyarova F.N., Radomskaya V.M., Gergel' N.I., Gussyakova O.A., Sidorova I.F., Kotel'nikov G.P., ed. *Blood groups: the biological variability of cellular composition and metabolism in normal and pathological conditions. [Gruppy krovi: biologicheskaya variabel'not' kletochnoy sostava i metabolizma v norme i patologii]*. Moscow: Izvestiya; 2007. (in Russian)
 12. Rod'kina O.M. Cellular blood composition and immunity indices in HIV-infected 0 (I) -AB (IV) blood groups. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya*. 2009; 7-8: 182-4. (in Russian)
 13. Gary L.M., Miller W.G., Coresh J., Fleming Ja., Greenberg N., Greene T. et al. Recommendations for improving the procedure of measuring serum creatinine: a report of the laboratory working group of the national educational program on diseases. *Kliniko-laboratornyy konsilium*. 2009; 3: 4-21. (in Russian)

REFERENCES

1. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Kumskovaya E.M. Features of modification of low density lipoproteins in the development of atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus. *Kardiologicheskii vestnik*. 2008; 3(1): 60-7. (in Russian)
2. Titov V.N., Khokhlova N.V., Shiryayeva Yu.K. Glucose, glycotoxins and glycation products of proteins: a role in pathogenesis. *Klinicheskaya meditsina*. 2013; 3: 15-24.
3. Ansari N.A., Rashid Z. Non-enzyme glycation of proteins: from diabetes to cancer. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2010; 56(2): 168-78. (in Russian)
4. Mayorova E.M., Garipova A.F. Diagnosis and treatment of coma in diabetes mellitus according to the latest recommendations for man-

- agement of patients with diabetes mellitus. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2015; 8(4): 64-8. (in Russian)
5. Kishkun A.A. *Guide to laboratory diagnostic methods. [Rukovodstvo po laboratornym metodam diagnostiki]*. Moscow.: GEOTAR-Media; 2007. (in Russian)
6. Men'shikov V.V. Analytical reliability of clinical laboratory information and the role of standards in its provision. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 12: 52-3. (in Russian)
7. Nikolaev N.S., Nazarova V.V., Dobrovol'skaya N.Yu., Pchelova N.N., Orlova A.V. Postanalytical stage: quality management of clinical laboratory studies. *Menedzher zdravookhraneniya*. 2016; 8: 36-45. (in Russian)
8. Lukicheva T.I., Men'shikov V.V. Preanalytical stage in measuring the concentration of catalytic activity of enzymes: features and aims of standardization. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 5: 9-12. (in Russian)
9. Guder W, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt Y, Toepfer G, Goerlitz H et al. The hemolytic, icteric and lipemic sample recommendations regarding their recognition and prevention of clinically relevant interferences. *J. Lab Med*. 2000; 24: 357-64.
10. Radomskaya V.M., Denisova S.R., Babichev A.R. *Metabolic features of blood in connection with different group affiliation*. In: *Materials of the interregional scientific and practical conference «Actual issues of postgraduate education and health»*. Samara: Samarskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet; 2008. (in Russian)
11. Gil'miyarova F.N., Radomskaya V.M., Gergel' N.I., Gussyakova O.A., Sidorova I.F., Kotel'nikov G.P., ed. *Blood groups: the biological variability of cellular composition and metabolism in normal and pathological conditions. [Gruppy krovi: biologicheskaya variabel'not' kletochnoy sostava i metabolizma v norme i patologii]*. Moscow: Izvestiya; 2007. (in Russian)
12. Rod'kina O.M. Cellular blood composition and immunity indices in HIV-infected 0 (I) -AB (IV) blood groups. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya*. 2009; 7-8: 182-4. (in Russian)
13. Gary L.M., Miller W.G., Coresh J., Fleming Ja., Greenberg N., Greene T. et al. Recommendations for improving the procedure of measuring serum creatinine: a report of the laboratory working group of the national educational program on diseases. *Kliniko-laboratornyy konsilium*. 2009; 3: 4-21. (in Russian)

Поступила 07.12.17

Принята к печати 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.12-008.331.1-07:616.154:577.175.534]:613.863

Орлова Н.В., Спирыкина Я.Г., Морунин О.Е.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ КОРТИЗОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ ПРИ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ УСТОЙЧИВОСТИ К СТРЕССОРНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава РФ, 117997, Москва, Россия

Проанализированы результаты определения уровня кортизола в предоперационном периоде у 63 больных (возраст 45–50 лет) с гипертонической болезнью (ГБ) I–II степени с различной стрессоустойчивостью перед плановой артроскопией. Стрессоустойчивость определяли с применением тестов Perceived Stress Scale (PSS) и the Depression, Anxiety and Stress Scale (DASS). Анализ результатов тестирования у большинства пациентов показал средний уровень стресса и среднюю тревожность перед операцией. Выделены 20 стрессоустойчивых пациентов и 43 нестрессоустойчивых. Уровень кортизола в предоперационном периоде оказался достоверно выше у пациентов с низкой стрессоустойчивостью. При оценке данных по результатам суточного мониторирования артериального давления (СМАД) до проведения артроскопии выявлено, что у нестрессоустойчивых пациентов наблюдалось более выраженное увеличение скорости утреннего подъема систолического артериального давления (САД) и диастолического артериального давления (ДАД) в сравнении со стрессоустойчивыми пациентами. После хирургического вмешательства скорости утреннего подъема САД и ДАД также были выше у нестрессоустойчивых пациентов; у них также выявлены более низкие величины суточного индекса (СИ) САД (non-dipper). У стрессоустойчивых пациентов СИ САД до и после операции был в пределах нормы. Средние

Для корреспонденции: Орлова Наталья Васильевна, д-р мед. наук, доц., проф., и.о. зав. каф. поликлинической терапии лечебного факультета; e-mail: vrach315@yandex.ru

значения САД и ДАД регистрировались в пределах нормальных значений, однако также были выше в до- и послеоперационном периоде у пациентов с низкой стрессоустойчивостью. Полученные результаты отражают изменения функции сердечно-сосудистой системы в ответ на психологический предоперационный стресс, который более выражен у пациентов с низкой стрессоустойчивостью.

Ключевые слова: стресс; периоперационный период; кортизол; стрессоустойчивость; артериальное давление.

Для цитирования: Орлова Н.В., Спирыкина Я.Г., Моруннов О.Е. Определение уровня кортизола в плазме крови пациентов с артериальной гипертензией при разной степени устойчивости к стрессорным воздействиям. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (4): 210-215. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-210-215>

Orlova N.V., Spiryakina Ya.G., Morunov O.E.

THE DETECTION OF CORTISOL LEVEL IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION AT RESISTANCE TO STRESS IMPACTS OF VARIOUS DEGREE

The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "N.I. Pirogov Russian National Research Medical University" Minzdrav of Russia, 117997, Moscow, Russia

The analysis was applied to the results of detection of level of cortisol in pre-operational period before planned arthroscopy in 63 patients (aged from 45 to 50 years) with hypertension disease stage I and II with different stress resistance. The stress resistance was detected using such tests as Perceived Stress Scale (PSS) and the Depression, Anxiety and Stress Scale (DASS). In most of patients, the analysis of results of testing demonstrated an average level of stress and average anxiety before the operation. 20 stress resistant patients and 43 stress non-resistant patients were picked out. The level of cortisol in pre-operational period turned out reliably higher in patients with low stress resistance. The data analysis according results of day monitoring of blood pressure prior to implementation of arthroscopy established that in stress non-resistant patients a more expressed increasing of velocity of morning rising of systolic and diastolic blood pressure as compared to stress resistant patients. After surgical intervention, velocities of morning rising of systolic and diastolic blood pressure also were higher in stress non-resistant patients. They also had lower values of day index of systolic blood pressure (non-dipper). In stress resistant patients, day index of systolic blood pressure before and after was within the limits of standard values. The average values of systolic and diastolic blood pressure registered within limits of on standard values. However, they were higher in pre- and post-operational periods among patients with low stress resistance. The received results reflect alteration of function of cardio-vascular system in response to psychological stress that is more expressed in patients with low stress resistance.

Key words: stress; peri-operational period; cortisol; stress resistance; blood pressure.

For citation: Orlova N.V., Spiryakina Ya.G., Morunov O.E. The detection of cortisol level in blood plasma of patients with arterial hypertension at resistance to stress impacts of various degree. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(4): 210-215. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-210-215>

For correspondence: Orlova N.V., doctor of medical sciences, associate professor, professor, acting head of the chair of Polyclinic Therapy of the Medical Faculty of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "N.I. Pirogov Russian National Research Medical University", e-mail: vrach315@yandex.ru

Information about authors:

Orlova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-4293-3285>

Spiryakina Ya.G., <https://orcid.org/0000-0002-1006-4118>

Morunov O.E., <https://orcid.org/0000-0003-4396-9500>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 24.01.2018
Accepted 07.02.2018

Артериальная гипертензия является одним из самых распространенных заболеваний. Для борьбы с артериальной гипертензией важно выявление факторов риска её развития. Одним из факторов риска является повышение артериального давления в операционном периоде. Российское общество анестезиологов и реаниматологов отмечает, что артериальное давление (АД) выше 180/100 мм рт. ст., поражение органов-мишеней и нелеченая гипертензия увеличивают риск осложнений. Риски сердечно-сосудистых осложнений операционного периода связаны непосредственно с хирургическим вмешательством, а также с психологическим предоперационным стрессом [1]. Гипертензивные реакции на острый психический стресс неблагоприятно влияют на риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). Стресс через нейро-гуморальные механизмы приводит к повышению артериального давления. Увеличение уровня кортизола в условиях стресса повышает чувствительность кровеносных сосудов к действию сосудосуживающих нейротрансмиттеров, сопровождается электролитными нарушениями и задержкой жидкости, что способствует развитию гипертензивных реакций. Выраженность воздействия стресса на сердечно-сосудистую систему (ССС) зависит от психологи-

ческого состояния пациента и его стрессоустойчивости [2].

Стресс может быть обусловлен различными причинами, может быть связан с личными событиями: смерть близких людей, развод, увольнение с работы. Стресс могут вызывать не только негативные, но и положительные события. Однако, несмотря на причины, развитие стрессорных реакций происходит по одинаковой схеме и направлено на нивелирование негативных последствий стресса для организма. Контроль за стрессорными реакциями осуществляется гипоталамусом, гипофизарно-гипоталамо-надпочечниковой и симпатoadреналовой системами. Вырабатываемые этими системами гормоны кортизол, кортикостерон, альдостерон, адреналин, норадреналин, андрогены получили название гормонов стресса. В выработке гормонов стресса принимает участие щитовидная железа, вырабатывающая гормоны тироксин и трийодтиронин, а также гипофиз, продуцирующий пролактин, аденокортикотропный гормон (АКТГ), фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон и гормон роста. Дифференцированная выработка гормонов стресса зависит от разницы воздействия физического и психического стресса и от длительности воздействия стресса. Под воздействием гормонов меняются функции органов и систем, по-

вышается уровень артериального давления и уровень глюкозы в крови. Данные процессы повышают адаптацию мышц и головного мозга в неблагоприятных условиях, однако при длительном воздействии стресса могут приводить к негативным последствиям [3]. Один из наиболее важных гормонов – кортизол, являясь гормоном стресса, в то же время получил название «гормон смерти». Гормон вырабатывается не только при психическом стрессе, но и при физических нагрузках, при травме, голоде. Кортизол в условиях стресса ответственен за обеспечение организма энергией за счёт повышения уровня глюкозы, он также регулирует АД, тормозит развитие воспалительных реакций, уменьшает проницаемость сосудистых стенок, снижает активность иммунной системы. Однако чрезмерная, длительная продукция кортизола приводит к негативным последствиям: снижается противодействие инфекционным агентам, развиваются гипертензивные реакции и склонность к тахисистолии, возможны разрушение и гибель нейронов в гиппокампе, снижение выработки серотонина, дофамина и развитие депрессии. Изучение уровня кортизола у обезьян в условиях эмоционального стресса выявило, что уровень стрессорного гормона отражал стрессоустойчивость животного и влиял на адаптацию к стрессу [4]. Проведённые исследования на добровольцах показали снижение выраженности стрессорных реакций у испытуемых при искусственном снижении уровня кортизола [5].

Цель нашего исследования – определение уровня кортизола в периоперационном периоде при артроскопических операциях у больных гипертонической болезнью с различной стрессоустойчивостью и сопоставление полученных результатов с суточной вариабельностью артериального давления.

Материал и методы. Исследование проводилось на базе Университетской клиники общей врачебной практики ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» в отделении артрологии ГКБ № 13 г. Москвы.

Выбор вида хирургического вмешательства в группе исследуемых пациентов был обусловлен малой инвазивностью оперативного вмешательства при артроскопии, малой кровопотерей, относительно небольшой продолжительностью и однократностью анестезии. Проведён анализ 484 историй болезни прооперированных пациентов в отделении травматологии ГКБ № 13 в 2017 г. (из них 228 женщин и 256 мужчин) для оценки частоты встречаемости гипертензивных реакций в периоперационном периоде артроскопических операций. В исследование по определению кортизола включены 63 пациента (в возрасте 45–50 лет) с гипертонической болезнью (ГБ) I–II степени с плановой артроскопией. Диагноз артериальной гипертензии устанавливали согласно Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), разработанной Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ). Критерии включения пациента в исследование: согласие пациента на участие в исследовании, возраст 30–60 лет, наличие в анамнезе артериальной гипертензии, целевые цифры АД на проводимой терапии, предстоящее оперативное вмешательство на суставах. Критерии исключения пациента из исследования: наличие в анамнезе инфаркта миокарда, острого нарушения мозгового кровообращения, вторичной гипертензии, заболеваний эндокринной системы, нарушений ритма, наличие депрессии (по результатам тестирования), наличие дополнительной седативной терапии в предоперационном периоде, осложнения в операционном периоде, приём лекарственных препаратов, влияющих на выработку кортизола.

Забор крови для определения кортизола проводили утром накануне хирургического вмешательства. Определение уровня кортизола проведено в Консультативно-диагностическом центре № 6 САО г. Москвы, в Централизованной клинко-диагностической лаборатории. Диагностику проводили методом электрохемилюминесценции на автоматическом имму-

нохимическом анализаторе COBAS 6000 с использованием набора реагентов фирмы «Roche Diagnostics». Референтный интервал: (171,0–536,00) нмоль/л.

Для выявления наличия депрессии, оценки стрессоустойчивости, уровня тревожности и стресса использованы тесты на стрессоустойчивость (проводились на этапе планирования операции): 1) Perceived Stress Scale – PSS, шкала стресса, в которую входят 10 вопросов, за каждый вопрос начисляются баллы (от 0 до 4), при подсчёте баллов производится инверсия баллов в вопросах 4, 5, 7 и 8 (0 = 4; 1 = 3; 2 = 2; 3 = 1; 4 = 0), после чего производили суммирование баллов и определяли уровень стресса (0–13 баллов – низкий уровень, 14–26 баллов – средний уровень, 27–40 баллов – высокий уровень); 2) the Depression, Anxiety and Stress Scale – DASS, шкала депрессии, тревожности и стресса, в которую входят 42 вопроса, за каждый вопрос начисляются баллы (от 0 до 3), при подсчёте баллов каждый определённый вопрос соответствует определённому параметру (депрессии, тревожности или стрессу), после чего определяется уровень каждого из параметров (для депрессии: 0–9 баллов – нормальный уровень, 10–13 баллов – низкий уровень, 14–20 баллов – средний уровень, 21–27 баллов – высокий уровень, выше 28 баллов – очень высокий уровень; для тревожности: 0–7 баллов – нормальный уровень, 8–9 баллов – низкий уровень, 10–14 баллов – средний уровень, 15–19 баллов – высокий уровень, выше 20 баллов – очень высокий уровень; для стресса: 0–14 баллов – нормальный уровень, 15–18 баллов – низкий уровень, 19–25 баллов – средний уровень, 26–33 баллов – высокий уровень, выше 34 баллов – очень высокий уровень); 3) шкала Ч.Д. Спилберга, Ю.Л. Ханина – шкала самооценки уровня тревожности, в которую входят 40 вопросов, за каждый вопрос начисляются баллы (от 1 до 4). Шкала состоит из двух частей, отдельно оценивающих реактивную тревожность (РТ, вопросы 1–20) и личностную тревожность (ЛТ, вопросы 21–40). При интерпретации результаты оценивали следующим образом: до 30 баллов – низкая тревожность; 31–45 баллов – умеренная тревожность; 46 баллов и более – высокая тревожность; 4) шкала психологического стресса RSM-25 (использовалась в период планирования и непосредственно перед операцией), в которую входят 25 вопросов, за каждый вопрос начисляются баллы (от 1 до 8). Подсчитывается сумма всех ответов – интегральный показатель психической напряжённости (ППН). Вопрос 14 оценивается в обратном порядке. Чем больше ППН, тем выше уровень психологического стресса: ППН меньше 100 баллов – низкий уровень стресса, ППН в интервале 100–154 балла – средний уровень стресса, ППН 155 баллов и больше – высокий уровень стресса. Группы стрессоустойчивых и нестрессоустойчивых больных сформированы на основании результатов тестирования и были сопоставимы по полу и возрасту.

Инструментальное обследование проводилось на аппарате суточного мониторинга артериального давления (СМАД – аппарат ЭДНИТ Meditech ABPM-02, «Гедеон Рихтер», Венгрия) до хирургического вмешательства и на следующие сутки после вмешательства. Полученные результаты проанализированы с использованием компьютерной программы Medibase. В дневные часы (с 7 до 23 ч) измерения производились с интервалом 1 раз в 15 минут, в ночные (с 23 до 7 ч) – 1 раз в 30 минут. При необходимости производились внеочередные измерения АД с последующей отметкой в дневнике (на время проведения суточного мониторинга пациент вёл дневник, в котором были отражены периоды физической активности, приёмы лекарственных препаратов и др.) После проведения мониторинга данные исследования переносили на компьютер и анализировали с помощью программы Medibase.

При анализе рассматривались следующие параметры: средние, минимальные и максимальные показатели АД, среднесуточные показатели АД (систолическое АД (САД), диа-

столическое АД (ДАД), мм рт. ст.), а также частота сердечных сокращений (ЧСС), уд/мин, вариабельность АД (%) рассчитывалась как стандартное отклонение (SD) от среднего значения, суточный индекс АД (СИ, %) рассчитывали для выделения типов суточного профиля: dipper (10–22%), non-dipper (< 10%), over-dipper (> 22%), night peaker (< 0%), скорость утреннего подъёма АД (мм рт. ст.) рассчитывали в виде разницы между максимальным и минимальным значением АД в утренние часы, в пределах определённого периода времени (с 4 до 10 ч).

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы Statistica 8.0. Для описания количественных показателей использовали среднее значение и стандартное отклонение. О достоверности различий показателей судили по величине *t*-критерия Стьюдента с предварительной проверкой распределения на нормальность. Результаты исследования рассматривали как статистически значимые при $p \leq 0,05$.

Результаты. Из 484 пациентов, прооперированных в 2017 г., у 124 (25,6%) имела место гипертоническая болезнь (из 124 больных женщины составляли 70%, мужчины 30%). Среди них подъём АД накануне операции выявлен у 87 (70%) человек. У пациентов без ГБ в анамнезе подъёмы АД отмечены у 28 (7,8%) человек, из них 64% мужчин, 36% женщин. Уровень повышения систолического артериального давления находился в диапазоне 150–200 мм рт. ст.

По предварительному тестированию (шкала DASS) пациенты с клинически выраженной депрессией исключались из исследования (табл. 1). Предоперационный стресс испытывали большинство пациентов, особенно женщины. По результатам тестов на стрессоустойчивость, проведённых у 63 больных, были сформированы 2 группы пациентов: 20 пациентов стрессоустойчивых и 43 пациента нестрессоустойчивых. Пациенты, отнесенные по минимум двум шкалам к уровню стресса среднему и выше среднего, включались в группу нестрессоустойчивых.

Анализ результатов тестирования показал средний уро-

вень стресса и среднюю тревожность у большинства пациентов. Высокая степень тревожности по шкале Спилберга/Ханина и высокий уровень стресса по шкале PSS выявлены преимущественно у женщин (табл. 2).

При обследовании больных в предоперационном периоде более высокие уровни кортизола выявлены у нестрессоустойчивых пациентов, при этом у женщин уровень кортизола в двух группах был выше, чем у мужчин. Выявленные различия достоверно значимы (табл. 3).

При оценке данных по результатам СМАД (табл. 4) до хирургического лечения выявлено, что у нестрессоустойчивых пациентов наблюдалось более выраженное увеличение скорости утреннего подъёма САД и ДАД в сравнении со стрессоустойчивыми пациентами. После хирургического вмешательства скорости утреннего подъёма САД и ДАД также были выше у нестрессоустойчивых пациентов.

У нестрессоустойчивых пациентов выявлены более низкие величины суточного индекса САД (non-dipper): СИ САД до операции: $-9,0 \pm 3,1$, после операции $-7,0 \pm 3,8$, до операции СИ ДАД -8 ± 4 , после операции $-6,5 \pm 4,3$. У стрессоустойчивых пациентов СИ САД до операции и после операции были в пределах нормы, СИ ДАД до операции $-11,0 \pm 2,3$, после операции $-9,5 \pm 3,0$ ($p < 0,05$). Средние значения САД и ДАД регистрировались в пределах нормальных значений, однако также были выше в до- и послеоперационном периоде у пациентов с низкой стрессоустойчивостью ($p < 0,03$).

Обсуждение. Полученные в настоящем исследовании данные о процентном соотношении гипертоников приближаются к данным других авторов, указывающих, что доля пациентов с сопутствующей артериальной гипертонией при плановых оперативных вмешательствах колеблется около 35–50%. Полученные результаты продемонстрировали высокую частоту гипертензивных реакций в предоперационном периоде у больных гипертонической болезнью, а также риск подъёма АД у пациентов, ранее не страдавших гипертонической болезнью и не фиксировавших повышение артериаль-

Таблица 1

Результаты тестов на стрессоустойчивость по шкале DASS

Пол	Депрессия					Тревога					Стресс				
	normal	mild	moderate	severe	extr. severe	normal	mild	moderate	severe	extr. severe	normal	mild	moderate	severe	extr. severe
Муж. (n=24)	21	3	–	–	–	4	13	7	–	–	3	9	11	1	–
Жен. (n=39)	36	3	–	–	–	12	18	9	–	–	4	7	28	–	–

Примечание. Normal – нормальный уровень; mild – легкой степени; moderate – умеренной степени; severe – тяжелой степени; extr. severe – очень тяжелой степени.

Таблица 2

Уровни стресса и степени тревожности у пациентов, определённые по шкале стресса PSM25, шкале Спилберга/Ханина, шкале PSS

Пол	Шкала стресса PSM25			Шкала Спилберга/Ханина			Шкала PSS		
	низкий уровень	средний уровень	высокий уровень	низкая тревожность	средняя тревожность	высокая тревожность	low stress	moderate stress	high perceived stress
Мужчины (n=24)	9	13	2	6	18	–	7	17	–
Женщины (n=39)	13	22	4	10	25	4	14	23	2

Таблица 3

Уровни кортизола у больных АГ в предоперационном периоде в зависимости от стрессоустойчивости

Показатель	Стрессоустойчивые (n = 20)			Нестрессоустойчивые (n = 43)		
	мужчины (n = 8)	женщины (n = 12)	достоверность различий	мужчины (n = 16)	женщины (n = 27)	достоверность различий
Кортизол, нмоль/л	320,20 ± 65,50	357,40 ± 54,40	$p < 0,03$	460,00 ± 45,20	554,50 ± 24,40	$p < 0,05$

Показатели СМАД до и после проведения хирургического лечения

Показатель	Стрессоустойчивые (n = 20)			Нестрессоустойчивые (n = 43)		
	До хир. лечения	После хир. лечения	Достоверность различий	До хир. лечения	После хир. лечения	Достоверность различий
СИ САД, %	12,0 ± 2,7	11 ± 3	p < 0,05	9,0 ± 3,1	7,0 ± 3,8	p < 0,05
СИ ДАД, %	11,0 ± 2,3	9,5 ± 3,0	p < 0,05	8 ± 4	6,5 ± 4,3	p < 0,05
Величина утреннего подъёма САД, мм рт. ст.	48 ± 16	53 ± 18	p < 0,03	54 ± 20	56,5 ± 24,0	p < 0,03
Величина утреннего подъёма ДАД, мм рт. ст.	37 ± 21	41 ± 24	p < 0,03	39 ± 25	42,5 ± 7,5	p < 0,03
Скорость утреннего подъёма САД, мм рт. ст./ час	28,0 ± 14,3	30,0 ± 15,4	p < 0,05	28,5 ± 13,4	30,0 ± 16,5	p < 0,05
Скорость утреннего подъёма ДАД, мм рт. ст./ час	18,0 ± 11,5	22,0 ± 12,5	p < 0,05	19,0 ± 8,4	22,5 ± 9,2	p < 0,05
ПАД, мм рт. ст.	48 ± 11	54,5 ± 13,0	p < 0,008	50,5 ± 16,0	55 ± 18	p < 0,008
Вариабельность САД, мм рт. ст.	18,5 ± 4,5	20,0 ± 5,2	p < 0,05	19,4 ± 4,7	22,0 ± 6,1	p < 0,05
Вариабельность ДАД, мм рт. ст.	14,0 ± 2,2	15,0 ± 2,5	p < 0,05	16,5 ± 6,0	18 ± 9	p < 0,05
Средн. САД, мм рт. ст.	125 ± 25	130,0 ± 28,5	p < 0,05	128 ± 30	135 ± 35	p < 0,05
Средн. ДАД, мм рт. ст.	80,0 ± 16,3	82 ± 18	p < 0,05	84,0 ± 19,7	88 ± 23	p < 0,05
Средн. САД дн., мм рт. ст.	122 ± 18	124,0 ± 19,4	p < 0,03	122 ± 21	125,0 ± 22,5	p < 0,03
Средн. ДАД дн., мм рт. ст.	74 ± 8	77,0 ± 10,2	p < 0,03	73 ± 11	80,0 ± 12,8	p < 0,03
Средн. САД ночн., мм рт. ст.	112,0 ± 12,5	115,0 ± 13,5	p < 0,05	118 ± 13	122,0 ± 16,5	p < 0,05
Средн. ДАД ночн., мм рт. ст.	65 ± 9	70,0 ± 11,2	p < 0,05	66,0 ± 11,8	73 ± 13	p < 0,05

ного давления. Факт высокого распространения гипертензивных реакций в предоперационном периоде актуализирует проблемы поиска причин повышения АД, профилактики и коррекции гипертензивных реакций.

Более высокие значения уровня кортизола у нестрессоустойчивых пациентов соотносятся с данными других авторов, изучающих проблему периоперационного стресса. Исследователи чаще всего операционное воздействие оценивают как травматический стресс, включая болевой фактор [6]. Большое значение при этом отводится выбору анестезии. Выявлена обратная зависимость интенсивности ощущения боли по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) в послеоперационном периоде после венэктомии в бассейне большой подкожной вены и потребности дополнительной анальгезии от уровня кортизола [7]. При низком уровне кортизола порог болевой чувствительности был выше. На основании полученных результатов авторы делают вывод о возможности использования кортизола в качестве критерия неадекватной анестезии. Однако в работах последних лет появилось предположение о возможности снижения под действием кортизола выраженности стрессорных реакций. При этом отмечается, что изменения уровней свободного и связанного кортизола носят разнонаправленный характер. При хирургических вмешательствах уровень связанного кортизола снижается, а общего повышается [8].

Большинство авторов отмечают гендерные и возрастные различия стрессоустойчивости в периоперационном периоде, которую также оценивали, используя в качестве маркера кортизол [9]. В частности, у пожилых пациентов в периоперационном периоде высокий уровень кортизола соответствовал более значимому стрессорному ответу на хирургическое вмешательство. В исследованиях также определено влияние различных видов анестезии на послеоперационный стресс и выявлено преимущество спинальной анестезии. Таким образом, кортизол является маркером выраженности периоперационного стресса и может использоваться для оценки адекватности анестезии и подбора терапии [10].

Заключение. Психологический стресс даже перед малоинвазивной артроскопической операцией низкого риска (менее 1%) провоцирует подъем АД у 70% пациентов с ГБ. Уровень кортизола в предоперационном периоде, выраженность подъёма АД и изменение вариабельности АД в периоперационном периоде зависят от стрессоустойчивости пациентов. Низкая стрессоустойчивость в условиях предоперационного психологического стресса становится дополнительным фактором риска развития сердечно-сосудистых осложнений у больных с ГБ и может быть выявлена с помощью психологического тестирования.

стойчивость в условиях предоперационного психологического стресса становится дополнительным фактором риска развития сердечно-сосудистых осложнений у больных с ГБ и может быть выявлена с помощью психологического тестирования.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

- Абабков В.А., Перре М. *Адаптация к стрессу. Основы теории, диагностики, терапии.* Санкт-Петербург: Речь; 2004.
- Порядин Г.В., Зеличенко Л.И. *Стресс и патология: методическое пособие.* Москва: Российский государственный медицинский университет; 2009.
- Удот В.В., Попова Г.А., Бородулина Е.В. Адаптивные эффекты дексаметазона при стрессирующих воздействиях. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2006; 142(11): 528-31.
- Ежевская А.А. Проблема обезболивания у пациентов пожилого и старческого возраста (обзор литературы). *Тольяттинский медицинский консилиум.* 2013; 3-4: 120-7.
- Антипов А.А. Кортизол суточной мочи как критерий адекватности защиты больного от операционного стресса и послеоперационного болевого синдрома. *Сибирское медицинское обозрение.* 2007; 44(3): 20-3.
- Козлов А.И., Козлова М.А. Кортизол как маркер стресса. *Физиология человека.* 2014; 40(2): 123-36.
- Большаков А.А., Глаголев Н.С., Зарадей И.И. Изучение уровней кортизола при операционном стрессе при выполнении операций на органах брюшной полости у людей разных возрастов. *Геронтология.* 2014; 2(3): 297-304.

REFERENCES

- Backé E M, Seidler A, Latza U, Rossnagel K, Schumann B. The role of psychosocial stress at work for the development of cardiovascular diseases: a systematic review. *Intern. Arch. Occup. Environ. Health.* 2012; 85(1): 67-79.
- Ababkov V.A., Perre M. *Adaptation to stress: Fundamentals of theory, diagnosis, therapy.* [Adaptatsiya k stressu. Osnovy teorii, diagnostiki, terapii]. St.-Peterburg: Rech'; 2004. (in Russian)
- Edward E. Smith, Rita L. Atkinson, E. R. Hilgard. Atkinson & Hilgard's Introduction to Psychology. 14th ed. Belmont: Wadworth/Thomson Learning; 2003.
- Poryadin G.V., Zelichenko L.I. *Stress and pathology. Methodological*

- manual/ *Stress i patologiya: metodicheskoe posobie*. Moscow: Rossiyskiy gosudarstvennyy meditsinskiy universitet; 2009. (in Russian)
5. Udut V.V., Popova G.A., Borodulina E.V. Adaptive effects of dexamethasone under stresses. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2006; 142(11): 528-31. (in Russian)
6. Ezhevskaya A.A. The problem of anesthesia in elderly and senile patients (review). *Tol'yatinskiy meditsinskiy konsilium*. 2013; 3-4: 120-7. (in Russian)
7. Antipov A.A. Daily urine cortisol as a criterion of adequacy of patient protection from operational stress and postoperative pain syndrome. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie*. 2007; 44(3): 20-3. (in Russian)
8. Kozlov A. I., Kozlova M. A. Cortisol as a marker of stress. *Fiziologiya cheloveka*. 2014; 40(2): 123-36. (in Russian)
9. Bol'shakov A.A., Glagolev N.S., Zaradey I.I. The study of cortisol levels during operational stress when performing operations on the abdominal organs in people of different ages. *Gerontologiya*. 2014; 2(3): 297-304. (in Russian)
10. Nicholson G., Hall G.M., Burrin J.M. Peri-operative steroid supplementation. *Anaesthesia*. 1998; 53 (11): 1091-4.
- Поступила 24.01.18
Принята к печати 07.02.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.313.4:546.173.083

Соколов А.В., Костина Д.А., Маринчев С.С., Чаплыгин С.С., Колсанов А.В.

ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРИТОВ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443079, Самара

Оксид азота – сигнальная молекула в организме человека, характеризующаяся широким спектром биологических эффектов. Экзогенный NO образуется из пищевых нитратов, поступающих с зелёными листовыми овощами, такими как шпинат, петрушка, щавель, а также свёкла, огурцы и томаты. Бактерии в ротовой полости метаболизируют поступающие с пищей нитраты до нитритов. Нитриты, как промежуточные метаболиты NO, достаточно точно отражают концентрацию оксида азота. Цель данной работы – изучение аналитической значимости и эффективности экспресс-устройства для определения нитритов в слюне. В работе представлены результаты апробации экспресс тест-системы для полуколичественного определения содержания нитритов в слюне. Устройство представляет собой полую трубку, внутри которой расположен сенсорный элемент, работающий по принципу «сухой химии». Измеряли концентрацию нитритов в ротовой жидкости 100 здоровых людей обоего пола в возрасте от 16 до 45 лет. При употреблении овощей каждый день или 3–5 раз в неделю регистрируются более высокие уровни нитрит-анионов (14,9–15,7 мг/л), чем при употреблении овощей и соков 1–2 раза в неделю и реже (9,9 мг/л). Концентрации нитритов в слюне как регулярно тренирующихся, так и ведущих малоактивный образ жизни находятся в пределах нормы (11,9–14,9 мг/л). Средний уровень нитритов в слюне участников эксперимента с нормальным давлением составил 16,5 мг/л, что существенно выше, чем у лиц из групп с повышенным и пониженным давлением (10,2 и 10,4 мг/л соответственно).

Ключевые слова: оксид азота; нитриты; экспресс-анализ; сухая химия; диета; сердечно-сосудистая система.

Для цитирования: Соколов А.В., Костина Д.А., Маринчев С.С., Чаплыгин С.С., Колсанов А.В. Значимость определения нитритов в ротовой жидкости у здоровых людей. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (4); 215-219.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-215-219>

Sokolov A.V., Kostina D.A., Marinchev S.S., Chaplygin S.S., Kolsanov A.V.

THE SIGNIFICANCE OF DETECTION OF NITRITES IN ORAL FLUID OF HEALTHY PEOPLE

The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Samara State Medical University" of Minzdrav of Russia, 443079, Samara, Russia

The nitric oxide is a signal molecule in human organism characterized by a wide spectrum of biological effects. The exogenous nitric oxide is formed from food nitrates received with such green leafy vegetables as spinach, parsley, sorrel and also beet, cucumbers and tomatoes. The bacteria in oral cavity metabolize received with food nitrates up to nitrites. The nitrites as some intermediate metabolites of nitric oxide sufficiently exact reflect concentration of nitric oxide. The purpose of study is to examine analytical dependence and efficiency of express-device for detecting nitrites in saliva. The article presents the results of confirmation of test-system for half-quantitative detection of content of nitrites in saliva. The device represents a hollow tube with a sensorial element within functioning by the principle of "dry chemistry". The concentration of nitrites in oral cavity was measured in 100 healthy people of both genders aged from 16 to 45 years. In case of consuming vegetables every day or 3-5 times a week higher levels of nitrite-anions (14,9–15,7 mg/l) are registered than in case of consuming vegetables and juices 1-2 times a week and rarely (9,9 mg/l). The concentrations of nitrites in saliva both in cases of regular training and low-activity life-style are within the limits of standards (11,9–14,9 mg/l). The average level of nitrites in saliva of participants of experiment with normal pressure made up to 16.5 mg/l that is significantly higher than in individuals from groups with increased and decreased arterial pressure (10,2 and 10,4 mg/l correspondingly).

Key words: nitric oxide; nitrites; express-analysis; dry chemistry; diet; cardio-vascular system.

For citation: Sokolov A.V., Kostina D.A., Marinchev S.S., Chaplygin S.S., Kolsanov A.V. The significance of detection of nitrites in oral fluid of healthy people *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(4): 215-219. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-215-219>

Для корреспонденции: Костина Динара Александровна, науч. сотр. научно-образовательного центра «Медицинские диагностические микросистемы»; e-mail: din.kostina@yandex.ru

For correspondence: Kostina D.A., researcher of the Scientific Educational Center "The Medical Diagnostic Micro-Systems" of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Samara State Medical University", e-mail: dkostina@yandex.ru

Information about authors:

Sokolov A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4965-3136>

Kostina D.A., <http://orcid.org/0000-0001-7894-1431>

Marinchev S.S., <http://orcid.org/0000-0001-8088-419X>

Kolsanov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4144-7090>

Chaplygin S.S., <http://orcid.org/0000-0002-9027-6670>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support

Received 06.12.2017
Accepted 11.12.2017

Введение. Оксид азота (II) – сигнальная молекула в организме человека. NO характеризуется широким спектром биологических эффектов, таких как регуляция тонуса кровеносных сосудов, антикоагулянтные свойства, опосредует иммунный ответ и нейротрансмиссию [1]. NO обладает высокой диффузионной способностью, что обеспечивает возможность передачи сигнала на достаточно длинные дистанции от источника его синтеза. Эндогенный NO синтезируется из L-аргинина ферментом NO-синтазой (NOS) [2]. Экзогенный NO образуется из пищевых нитратов, поступающих с овощами. В большом количестве нитраты содержатся в зелёных листовых овощах, таких как шпинат, петрушка, щавель, а также в свёкле, огурцах и томатах [3, 4]. Большая часть поступивших нитратов всасывается в пищеварительном тракте в неизменённом виде, поступает в кровь, а затем почти полностью выводится из организма почками. Факультативные бактерии, живущие на дорсальной поверхности языка, с помощью фермента нитратредуктазы метаболизируют поступающие с пищей нитраты до нитритов, что составляет примерно 80% всех нитритов, присутствующих в содержимом желудка. В нормальной кислой среде желудка (pH 2,5) часть нитритов превращается в NO, а часть всасывается в кровь. В норме уровень нитритов в крови составляет 50–1000 нМ, концентрация в слюне в 20 раз выше, чем в крови [5–7]. Современные биомедицинские исследования показали, что диета, богатая нитратами, оказывает кардиопротекторное действие [8].

NO представляет собой короткоживущее и быстрометаболизирующееся соединение, поэтому его определение в биологических жидкостях практически невозможно. Рядом исследователей показано, что уровень нитритов достаточно точно отражает степень активности продуцирующего NO фермента NO-синтазы [9]. Для количественного определения нитритов в различных биологических жидкостях, в том числе в слюне, используют флуоресцентные [10], хемилюминесцентные методы [11], капиллярный электрофорез [12], газовую хроматографию и масс-спектрометрию [13], высокоэффективную жидкостную хроматографию [14]. Однако эти методы трудоёмки и требуют специального оборудования.

В настоящее время существуют многочисленные коммерческие экспресс-тесты, доступные для большинства потребителей, позволяющие контролировать своё здоровье, не выходя из дома [15]. К таким устройствам относится Berkeley Test [16], с помощью которого можно определять концентрацию нитритов в слюне на основе реакции Грисса. Это устройство ориентировано на спортсменов, людей, регулярно занимающихся различными видами спортивных тренировок, а также тех, кто уделяет внимание своему здоровью и физическому состоянию. Производитель сообщает, что с помощью этого теста можно контролировать уровень нитритов (NO) в слюне для обеспечения оптимального уровня тренировок. Тест рекомендуется проводить 3–4 раза в день и в соответствии с результатами анализа корректировать диету с высоким содержанием нитратов (употребление зелёных листовых овощей,

свекольного сока). Производитель утверждает, что уровень нитритов в слюне коррелирует с концентрациями в плазме крови, однако известно, что при определении метаболитов NO необходимо исключить дополнительное поступление нитратов с пищей [9]. Поэтому применение теста представляется сомнительным.

Для выяснения и подтверждения значимости данного теста нами были разработаны и апробированы портативные аналитические экспресс-устройства для определения концентрации нитрит-ионов в слюне на основе технологии «сухой химии».

Цель данной работы – изучение аналитической значимости и эффективности экспресс-устройства для определения нитритов в слюне.

Материалы и методы. Аппаратура. Аналитические весы GH 202 A&D, Япония; фотометр КФК-3-01-«ЗОМЗ», Россия; лиофильная сушилка «Иней-4», ИБП РАН, Россия; цветной принтер Epson Discproducer PP 100; многофункциональное устройство (МФУ) Canon i-sensys MF 211; автоматический тонометр Omron M2 Classic, Китай.

Реагенты. Реактив Грисса ч.д.а. («Вектон», Россия), полиэтиленгликоль-2000, (Sigma Aldrich). Реагенты растворяли в бидистиллированной воде по ГОСТ 6709–72.

Материалы для изготовления тест-устройств. Хроматографическая бумага Whatman №1 (Sigma Aldrich), прозрачные трубки из полимерного материала (Нерое-Пак, Китай, ПВХ, толщина 0,2 мм, длина 7 см, диаметр 5 мм), абсорбирующий волокнистый материал (Fleissner, Германия, диаметр 5 мм, длина 2 см).

Калибровка экспресс-устройств. Стандартный раствор нитрита натрия (50 мг/л) готовили в мерной колбе вместимостью 100 мл, растворяя 5 мг NaNO₂ в воде. Рабочие растворы (1, 6, 10, 20 мг/л) готовили путём разбавления стандартного раствора бидистиллированной водой. Оптическую плотность калибровочных растворов измеряли при 540 нм в кюветах с длиной оптического пути 0,5 см относительно холостой пробы, в которой раствор нитрита натрия заменён на дистиллированную воду.

В тест-устройства также вносили калибровочные растворы нитрита натрия. Через 30 с регистрировали окраску сенсорного элемента. Образцы, содержащие калибровочные растворы, оцифровывали с помощью МФУ в режиме цветного сканирования в формате TIFF при dpi 600. С помощью приложения Adobe Photoshop строили нативную цветовую шкалу, для того чтобы определять визуально наблюдаемую концентрацию нитрит-анионов в слюне по методу, описанному в [17].

На основе цветовой шкалы изготовили шкалу сравнения при помощи цветного принтера (разрешение изображения 5760×1440 dpi, цветокоррекция в режиме ICM).

Сборка устройства. Устройство сконструировано в соответствии с технологией «сухой химии» и представляет собой полую трубку из прозрачного полимерного материала,

Таблица 1

Концентрация нитрит-ионов в слюне в зависимости от частоты употребления овощей, содержащих высокие концентрации нитратов (салат, свёкла, редис, морковь, капуста, брокколи, томаты, огурцы)

Частота употребления овощей	Количество опрошенных	Концентрация $(\text{NO}_2)^- \bar{X} \pm m_x$, мг/л	p
Каждый день	34	14,9 $\pm$ 1,87	$\leq 0,05$
3–5 раз в неделю	32	15,7 $\pm$ 2,57	$\leq 0,05$
1–2 раза в неделю и реже	34	9,9 $\pm$ 1,01	$\leq 0,05$

Таблица 2

Концентрация нитрит-ионов в зависимости от интенсивности занятий спортом (дней в месяц)

Частота занятий спортом (фитнес)	Количество опрошенных	Концентрация $(\text{NO}_2)^- \bar{X} \pm m_x$, мг/л	p
Каждый день / несколько раз в неделю	59	14,9 $\pm$ 1,7	$\leq 0,05$
Несколько раз в месяц / редко / не занимаюсь	41	11,9 $\pm$ 1,63	$\leq 0,05$

внутри которой расположены сенсорный элемент (аналитическая бумага) и абсорбирующий слой.

На хроматографическую бумагу, предварительно обработанную 6% водным раствором ПЭГ, наносили реагенты для обнаружения нитрит-ионов – водный раствор реактива Грисса. Бумагу с реагентами высушивали в лиофильной сушилке в течение 30 мин в вертикальном положении. Готовую аналитическую бумагу разрезали на образцы размером 2,5 $\times$ 2,5 см и помещали в трубку.

Проведение анализа. Тест-устройство помещают в ротовую полость, в отверстие пробоотборника вносят достаточное для анализа количество слюны. Анализируемый компонент (нитрит-ион) взаимодействует с реагентами сенсорного элемента с образованием окрашенного комплекса, по интенсивности цвета которого можно судить о содержании нитритов в слюне. Для получения полуколичественного результата необходимо сравнить получившийся цвет ячейки с эталонной шкалой. Исследование проводили в течение дня, для анализа использовали неразбавленную слюну. Время принятия пищи при проведении анализа не учитывали.

Выборка. В нашем исследовании мы использовали ротовую жидкость здоровых людей – 100 человек обоего пола в возрасте от 16 до 40 лет. Исследование было добровольным и анонимным.

Перед проведением анализа участникам необходимо было ответить на вопросы в анкете: частота употребления овощей с высоким содержанием нитратов, а также частота занятий спортом (табл. 1, 2).

Всем участникам эксперимента перед началом анализа измеряли артериальное давление с помощью автоматического тонометра (табл. 3).

Статистическая обработка материала проведена с помощью офисного пакета STATISTICA© 10.0. Достоверность различий рассчитывали с применением t -критерия Стьюдента. За достоверный принимался уровень статистической значимости $p < 0,05$ [18].

Результаты. Для определения соответствия результатов анализа на содержание нитрит-ионов в слюне по показаниям прибора и полученных с помощью разрабатываемого изделия было отобрано 10 образцов слюны лиц мужского и женского пола в возрасте 30–35 лет. Разработанные тест-устройства позволяют получить полуколичественный результат и коррелируют с результатами инструментального метода [19].

Содержание нитритов в ротовой жидкости оценивали с учётом режима употребления овощей, богатых нитратами, частоты занятий спортом и уровня артериального давления, поскольку вышеуказанный Berkeley Test ориентирован на контроль содержания нитритов во время тренировок путём коррекции овощной диеты.

В нашем исследовании установлено, что концентрации нитритов в слюне зависят от частоты употребления овощей, содержащих большое количество нитратов. При употреблении овощей каждый день или 3–5 раз в неделю регистрируется более высокий уровень нитрит-анионов (14,9–15,7 мг/л), чем при употреблении овощей 1–2 раза в неделю и реже (9,9 мг/л). Однако концентрация нитрит-ионов в слюне во всех изученных группах находится в пределах нормы (рис. 1).

Изучая зависимость частоты физических тренировок и количества нитрит-ионов в слюне, не выявили статистически значимых различий. Концентрация нитритов в слюне как регулярно тренирующихся, так и ведущих малоактивный образ жизни находится в пределах нормы (11,9–14,9 мг/л). В каждой группе регистрировались как высокая концентрация нитрит-ионов (20–50 мг/л), так и низкое содержание нитритов (1 мг/л) (рис. 2).

Средний уровень нитритов в слюне участников эксперимента с нормальным давлением составил 16,5 мг/л, что существенно выше, чем у лиц из групп с повышенным и понижен-

ным давлением (10,2 и 10,4 мг/л соответственно). При этом высокий уровень нитрит-ионов (50 мг/л) регистрировался только в группе с нормальным давлением и всего у 10% испытуемых. Концентрация 1 мг/л чаще регистрировалась у лиц с пониженным и повышенным давлением (рис. 3).

Обсуждение. Вопросу о роли оксида азота в организме посвящено множество работ. До недавнего времени нитраты (NO_3^-) и нитриты (NO_2^-) считались инертными конечными продуктами метаболизма окиси азота (NO) и неблагоприятными диетическими компонентами. Однако показано, что нитраты и нитриты метаболизируются до оксида азота и других биоактивных соединений, оказывающих влияние на различные системы в организме. Нарушение физиологических процессов, регулируемых окисью азота, является причиной гипертонии, ишемии миокарда, тромбозов, рака. Именно по этой причине оксид азота представляет огромный интерес для биологов и медицинских работников [3].

Употребление фруктов и овощей, богатых нитратами, таких как свёкла, шпинат, салат, щавель, редька и сельдерей, является простым, естественным и недорогим способом улучшения показателей сердечно-сосудистой системы людей. Показано, что приём нитратов приводит к снижению потребления кислорода во время интенсивных тренировок без сопутствующего увеличения концентрации лактата, что свидетельствует о более эффективной выработке энергии. Кроме того, в некоторых исследованиях отмечается повыше-

Таблица 3

Концентрация нитрит-ионов в зависимости от артериального давления

Артериальное давление	Количество опрошенных	Концентрация $(\text{NO}_2)^- \bar{X} \pm m_x$, мг/л	p
Нормальное (110/70–130/85)	59	16,5 $\pm$ 1,9	$\leq 0,05$
Повышенное (>140/90)	15	10,2 $\pm$ 1,4	$\leq 0,05$
Пониженное (<100/60)	26	10,4 $\pm$ 1,7	$\leq 0,05$

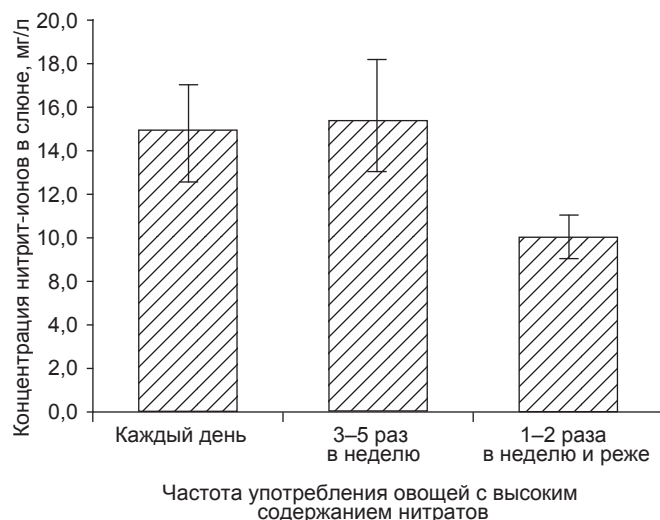


Рис. 1. Концентрация нитрит-ионов в слюне в зависимости от употребления овощей, содержащих высокие концентрации нитратов (салат, свёкла, редис, морковь, капуста, брокколи, томаты, огурцы).

ние выносливости на 1–2% при высокоинтенсивных тренировках на выносливость [24].

Полученные в нашем исследовании данные о содержании нитрит-ионов в слюне коррелируют с таковыми многих учёных. В работах S. Tannenbaum и соавт. [25] показано, что концентрация нитрит-аниона в слюне составляет в норме 6–10 мг/л. H. Kühn и соавт. [26] проводили исследования у 117 здоровых и страдающих гингивитом жителей Германии. Показатели нитрит-анионов в слюне ранжировали от 0,01 до 30 мг/л, среднее значение у здоровых людей составило 7 мг/л. R. Stephany и соавт. [27] продемонстрировали, что при употреблении 300–350 г овощей, содержащих большое количество нитритов или 400 мл овощного сока, через 2,5 ч концентрация нитритов в слюне составляла 175–200 мг/л. Похожий эксперимент проводили H. Nagada и соавт. [28] при употреблении типичных нитрат-богатых овощей, таких как китайская капуста, салат, шпинат, редис в количестве 100–

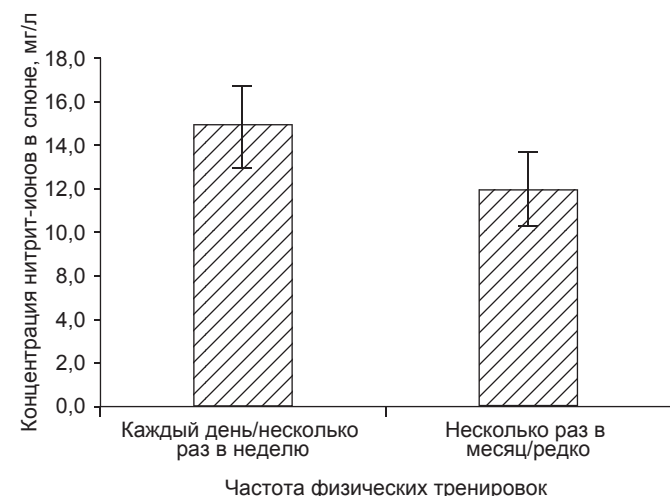


Рис. 2. Концентрация нитрит-ионов в зависимости от интенсивности занятий спортом (дней в месяц).

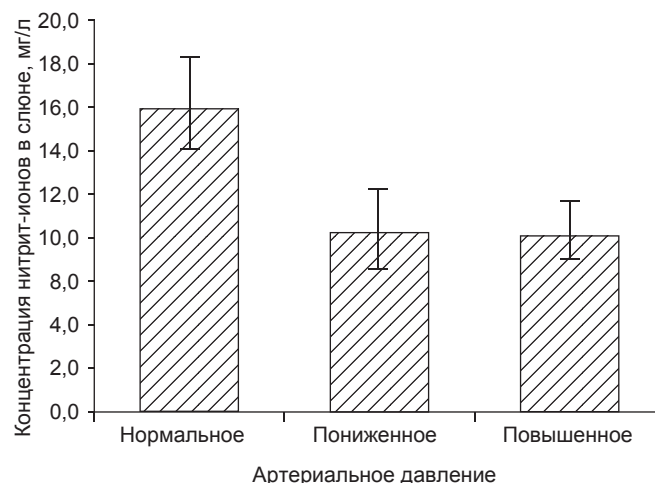


Рис. 3. Концентрация нитрит-ионов в зависимости от артериального давления.

200 г 2–3 раза в день в течение нескольких дней, концентрация нитрит-ионов в слюне составляла 14–72 мг/л (измерение проводили натошак).

Диета, богатая фруктами и овощами, способствует снижению артериального давления и защищает от сердечно-сосудистых заболеваний. A. Webb и соавт. [29] использовали свекольный сок в качестве источника нитратов у здоровых добровольцев и обнаружили снижение артериального давления в среднем на 10 мм рт.ст., что совпадает с пиковым уровнем нитрита в плазме крови. Кроме того, наблюдалось ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов *ex vivo*. Аналогичные данные были представлены J. Petersson [30], который наблюдал устойчивое влияние на артериальное давление при постоянном введении нитратных добавок у крыс. Это, с одной стороны, свидетельствует о важности энтеросаливариантной циркуляции нитратов и нитритов и ведущей роли нитратообразующих бактерий в его биоактивации, но тем не менее наблюдается незначительное изменение физиологических параметров, что, скорее, свидетельствует об эффективности механизма защиты от высоких концентраций экзогенного NO.

Считается, что активность перорально принимаемого неорганического нитрата заключается в его превращении в нитрит факультативными бактериями, обнаруженными на дорсальной поверхности языка. Проглатывание этой богатой нитритом слюны позволяет вводить нитрит в кровоток через желудок, где он превращается в мощный вазодилататор NO [31, 32]. В отличие от пути L-аргинин–NO образование NO из поступающих с пищей нитратов не требует активности NO-синтазы. В нормальных условиях примерно 25% системного нитрата активно поглощается слюнными железами. Нитраты и нитриты служат биологическими резервуарами для NO при гипоксии и обладают потенциальными терапевтическими свойствами при инфаркте миокарда, гипертонии, а также при физических нагрузках [33]. Концентрация оксида азота в крови является главным фактором, обуславливающим его биологический эффект. Для поддержания гомеостаза сердечно-сосудистой и нервной системы требуются концентрации NO ≤ 1 мкМ. Более высокие концентрации опосредуют образование высокореакционноспособного соединения – пероксинитрита. Избыточная продукция пероксинитрита носит патологический характер и приводит к модификации различных белков, липидов и нуклеиновых кислот. Инактивируются железосодержащие ферменты митохондрий, а также наблюдается торможение роста и размножения клеток. Избыток

оксида азота увеличивает проницаемость сосудов, вызывая отеки тканей [34]. Концентрация, образующихся нитритов в слюне гораздо выше концентрации нитритов в плазме крови, следовательно, делать вывод о каком-либо значительном влиянии экзогенного NO на физиологические параметры организма некорректно.

Заключение. Таким образом, при оценке результатов анализа следует учитывать диету, курение, стресс, физическую нагрузку, а также время забора биоматериала. Поэтому способ контроля уровня оксида азота по слюне, предлагаемый Berkeley Test не корректен, поскольку пищевые нитраты, поступающие в течение дня в организм человека, оказывают существенное влияние на конечное содержание нитритов в слюне и тем самым искажают результаты. Кроме того, из-за неправильной интерпретации результатов теста пользователь Berkeley Test может употреблять слишком высокие концентрации нитратов с пищей, что может привести к образованию пероксинитрита, обладающего неблагоприятными для организма свойствами.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—6, 8—17, 20—31
см. REFERENCES)

7. Садыков М.И., Трунин Д.А., Нестеров А.М., Чистякова М.С. Иммунологический и микробиологический статус полости рта у пациентов пожилого возраста при использовании съемных пластинчатых протезов. *Наука и инновации в медицине*. 2016; 2:50-4.
18. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г., Резванцев М.В. *Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований*. 3-е изд. доп. Ленинград: Издательство Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова; 2002.
19. Соловьев О.Н. Применение сухой химии в лабораторной диагностике. *Ремедиум Приволжье. Консилиум. Лабораторная диагностика*. 2015; 8: 138-7.

REFERENCES

1. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991; 43: 109-42.
2. Forstermann U., Schmidt H. H. W., Pollock J. S. et al. Isoforms of nitric oxide synthase: characterization and purification from different cell types *Biochem. Pharmacol.* 1991; 42: 1849-57.
3. Griesenbeck J.S., Steck M.D., Huber J.C., Sharkey J.R., Rene A.A., Brender J.D. Development of estimates of dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines for use with the short willet food frequency questionnaire. *Nutrition Journal*. 2009; 16 (8).
4. Hord N.G., Tang Y., Bryan N.S. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009; 90: 1-10.
5. Hezel M.P., Weitzberg E. The oral microbiome and nitric oxide homeostasis. *Oral Dis.* 2015; 21 (1): 7-16.
6. Benjamin N., Driscoll F., Dougall H. et al. Stomach NO synthesis. *Nature*. 1994; 368: 502.
7. Sadykov M.I., Trunin D.A., Nesterov A.M., Chistyakova M.S. Immunological and microbiological status of the oral cavity in elderly patients using removable laminar dentures. *Nauka i innovatsii v meditsine*. 2016; 2: 50-4. (in Russian)
8. Ghosh S.M., Kapil V., Fuentes-Calvo I. Enhanced Vasodilator Activity of Nitrite in Hypertension. Critical Role for Erythrocytic Xanthine Oxidoreductase and Translational Potential. *Hypertension*. 2013; 61: 1091-1102.
9. Granger D.L., Anstey N.M., Miller W.C., Weinberg J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods enzymol.* 1999; 301: 49-61.
10. Kojima H., Nakatsubo N., Kikuchi K., et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators, diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* 1998; 70: 2446-53.
11. Braman R.S., Hendrix S.A. Nanogram nitrite and nitrate determi-

- nation in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal. Chem.* 1989; 61: 2715-8.
12. Morcos E., Wiklund N.P. Nitrite and nitrate measurement in human urine by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 2001; 22: 2763-8.
13. Tsikas D. Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2000; 72: 4064-72.
14. Li H., Meininger C.J., Wu G. Rapid determination of nitrite by reversed-phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000; 746: 199-207.
15. Gubala V., Harris L.F., Ricco A.J., at al. Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Analytical Chemistry*. 2012; 82 (2): 487-515.
16. Green N., Green J. Compositions, apparatus and methods for monitoring biomarkers. Pat. WO2014039794 A2 USA. 13.03. 2014.
17. Kaewarsa P., Laiwattanapaisa W., Palasuwan A., Palasuwan D. A new paper-based analytical device for detection of Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Talanta*. 2017; 164 (1): 534-9.
18. Junkerov V.I., Grigor'ev S.G., Rezvancev M.V. Mathematical and statistical processing of medical research data. *Matematiko-statisticheskaja obrabotka dannyh medicinskih issledovanij*. 3rd ed. Leningrad: Izdatel'stvo Voenno-meditsinskoy ordena Lenina akademii im. S. M. Kirova; 2002. (in Russian)
19. Solov'ev O.N. Application of dry chemistry in laboratory diagnostics. Laboratory diagnosis. Remedium. Privolzh'e. *Laboratornaya diagnostika*. 2015; 8: 138-7. (in Russian).
20. Preethi S., Jose J.I., Sivapathasundharam B., Sabarinath B. Evaluation of Salivary Nitric Oxide Levels in Smokers, Tobacco Chewers and Patients with Oral Lichenoid Reactions. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016. 1 (10): 63-6.
21. Bodis S., Haregewoin A. Significantly reduced salivary nitric oxide levels in smokers. *Annals of Oncology*. 1994; 5: 371-2.
22. Wadhwa D., Bey A., Hasija M. et al. Determination of levels of nitric oxide in smoker and nonsmoker patients with chronic periodontitis. *J. Periodontal Implant Sci.* 2013. 43: 215-20.
23. Epperlein M.M., Nourooz-Zadeh J., Noronha-Dutra A.A. et al. Nitric oxide in cigarette smoke as a mediator of oxidative damage. *International Journal of Experimental Pathology*. 1996; 77: 197-200.
24. Liu A.H., Bondonno C.P., Croft K.D. et al. Effects of a nitrate-rich meal on arterial stiffness and blood pressure in healthy volunteers. *Nitric Oxide*. 2013; 35: 123-30.
25. Tannenbaum S.R., Sinskey A.J., Weisman M. Nitrite in Human Saliva. Its Possible Relationship to Nitrosamine Formation. *Journal of the National Cancer Institute*. 1974. 1(53): 79-84.
26. Kühn H.J. Untersuchung über den Investigation of the nitrate content in the saliva, depending on dental condition and dental care. Thesis: Heidelberg; 1974.
27. Stephany R.W., Schuller P.I. Messages from the national Institute for the health. *Liber Amicorum*. 1975; 33(34): 184-90.
28. Harada M., Ishiwata H., Nakamura Y., Tanimura A., Ishidate M. Studies on *in vivo* formation of nitroso compounds. I. Changes of nitrite and nitrate concentrations in human saliva after ingestion of salted Chinese cabbage. *J. Fd. Hyg. Soc.* 1975; 16: 11-8.
29. Webb A.J., Milsom A.B., Rathod K.S., Chu W.L. at al. Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to NO in hypoxia: role for Xanthine Oxidoreductase and eNOS. *Circ Res*. 2008; 103(9): 957-64.
30. Petersson J., Carlström M., Schreiber O., at al. Gastroprotective and blood pressure lowering effects of dietary nitrate are abolished by an antiseptic mouthwash. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; 46(8): 1068-75.
31. Griesenbeck J.S., Steck M.D., Huber J.C. Development of estimates of dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines for use with the short willet food frequency questionnaire. *Nutrition Journal*. 2009. 16 (8):1-9.
32. Sobko T., Marcus C., Govoni M., at al. Dietary nitrate in Japanese traditional foods lowers diastolic blood pressure in healthy volunteers. *Nitric Oxide*. 2010; 22: 136-40.
33. Eisenbrand G., Spiegelhalter B., Preussmann R. Nitrate and Nitrite in Saliva // *Oncology*. 1980; 37: 227-231.
34. Lundberg J.O., Gladwin M.T., Ahluwalia A., at al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics // *Nature Chemical Biology*. 2009; 5 (12): 865-9.

Поступила 06.12.17
Принята к печати 11.12.17

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ И ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ В КОЛИЧЕСТВЕННОМ ИССЛЕДОВАНИИ ЭЛЕМЕНТОВ МОЧИ

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», обособленное подразделение
Медицинский научно-образовательный центр, 119192, Москва, Россия

Проведено сравнение методов проточной цитофлюориметрии и оптической микроскопии в исследовании элементов мочи с целью определения необходимости верификации врачом КЛД результатов, полученных на анализаторе. Представлены итоговые данные по сопоставлению результатов, полученных двумя методиками для различных групп патологии. В группах с нормальным и превышающим значения нормы содержанием форменных элементов мочи можно избежать участия врача в валидации результатов. В подгруппах с наличием патологических элементов мочи (переходный и почечный эпителий, патологические цилиндры, кристаллы) рекомендуется проведение исследования цитофлюориметрическим методом с последующей верификацией методом оптической микроскопии.

Ключевые слова: цитофлюориметрический метод исследования; элементы мочи; взаимосвязь показателей элементов мочи; оптический метод исследования.

Для цитирования: Черников А.В., Самоходская Л.М., Дзитиев В.К., Камалов А.А. Сравнительная характеристика методов проточной цитофлюориметрии и оптической микроскопии в количественном исследовании элементов мочи. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (4): 220-223. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-220-223>

Chernikov A.V., Samokhodskaya L.M., Dzitiev V.K., Kamalov A.A.

THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF METHODS OF FLOW CYTOFLUOROMETRY AND OPTICAL MICROSCOPY IN QUALITATIVE STUDY OF URINE ELEMENTS

The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The M.V. Lomonosov Moscow State University", the Separate Sub-Division Medical Scientific Educational Center, 119192, Moscow, Russia

The comparative study was carried out concerning methods of flow cytofluorometry and optical microscopy in analysis of urine elements with the purpose of establishing the necessity of verification by physician the results of clinical diagnostic laboratory obtained by the analyzer. The final data concerning comparison of results obtained by two methodologies for various groups of pathology. The participation of physician in validation of results can be avoided in the groups with normal and exceeding standard values of content of corpuscular elements of urine. In the subgroups with pathological elements of urine (transitional and renal epithelium, pathological cylinders, crystals) it is recommended to implement analysis using cytofluorometric technique with subsequent verification by optical microscopy.

Key words: cytofluorometric technique; elements of urine; indices of elements of urine; optical technique of analysis.

For citation: Chernikov A.V., Samokhodskaya L.M., Dzitiev V.K., Kamalov A.A. The comparative characteristic of methods of flow cytofluorometry and optical microscopy in qualitative study of urine elements. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(4): 220-223. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-220-223>

For correspondence: Chernikov A.V., physician of clinical laboratory diagnostic of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The M.V. Lomonosov Moscow State University", the Separate Sub-Division Medical Scientific Educational Center, e-mail: chav23@mail.ru

Information about authors:

Chernikov A.V., orcid.org/0000-0001-9468-720X

Samokhodskaya L.M., <http://orcid.org/0000-0001-6734-3989>

Dzitiev V.K. <http://orcid.org/0000-0001-7558-589X>

Kamalov A.A., <http://orcid.org/0000-0003-4251-7545>

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

Funding. The work was carried out within the framework of scientific research approbation (Contract No. 0076 / A / MiK / 08-16 of 10 August 2016).

Received 29.11.2017
Accepted 16.01.2018

Введение. Общепринятым стандартом обследования пациентов является выполнение клинического анализа мочи, который включает исследование физико-химических свойств

Для корреспонденции: Черников Антон Владимирович, врач клин. лаб. диагностики; e-mail: chav23@mail.ru

и количественного состава осадка мочи. Такой диагностический подход позволяет с высокой точностью диагностировать воспалительный процесс в мочевыводящих путях, оценить функцию почек и ряд метаболических нарушений различного характера. Традиционное исследование осадка мочи методом световой микроскопии имеет ряд существенных недочё-

тов: высокая погрешность, невозможность стандартизации, сниженное количество субстрата исследования вследствие разрушения клеток при центрифугировании [1, 2].

Устранение перечисленных недостатков стало возможно с появлением новых технологий, что позволило работать с образцами малого объема, избегать центрифугирования в пробоподготовке и выполнять количественный подсчет форменных элементов в стандартном объеме [3, 4].

Тем не менее использование новых технологий не избавляет врача клинико-диагностической лаборатории от необходимости в верификации неопределенных результатов с помощью световой микроскопии. Целью нашего исследования было определить необходимость пересмотра результатов с помощью оптической микроскопии, полученных на анализаторе SysmexUX-2000, для различных групп пациентов с различной патологией.

Материал и методы. В исследование последовательно были включены больные поликлинического и стационарного звена Медицинского научно-образовательного центра МГУ, всего участвовало 600 пациентов в возрасте от 18 до 60 лет. Всем пациентам был выполнен общий анализ мочи, на основании результатов которого были сформированы группы: группа 1 – результаты количественного исследования состава мочи не выходят за пределы референсных интервалов (табл. 1); группа 2 – содержание форменных элементов превышает верхние пределы значений нормы; группа 3.1 – наличие в исследуемом материале патологических элементов, характерных для заболеваний, в патогенезе которых отсутствует поражение юкстагломерулярного аппарата (цистит, мочекаменная болезнь, кристаллурия) и группа 3.2 – в исследуемом материале присутствуют патологические элементы, характерные для заболеваний, в патогенезе которых ведущим звеном является поражение юкстагломерулярного аппарата (гипертоническая болезнь, сахарный диабет, гломерулонефрит) с последующим подтверждением принадлежности к группе на основании диагноза и дополнительной информации из медицинской карты пациента.

Исследования образцов выполнялись не позднее 4 ч с мо-

мента сбора мочи в одноразовую стерильную ёмкость. Полученный материал в лаборатории переносился в пластиковую пробирку без консервантов (Литопласт-Мед, Россия) [5].

Исследование элементов мочи выполняли методом проточной цитофлюориметрии на анализаторе SysmexUX-2000 (Sysmex Corporation, Япония). Аналитические способности анализатора позволяют дифференцировать до $65 \cdot 10^3$ частиц в 1 мкл мочи, что обеспечивает избыточную чувствительность при подсчёте элементов в материале на единицу объема. Используемые технологии позволяют в 800 мкл материала дифференцировать и определять в единице объема количество таких элементов, как лейкоциты, эритроциты (с информацией об источнике их появления во вторичной моче), клеток плоского эпителия, цилиндров (с дифференцировкой на нормальные и патологические), бактерий, дрожжеподобных клеток, кристаллов, малых круглых клеток (переходный и почечный эпителий), слизи, сперматозоидов, а также проводимости мочи. Для корректного сравнения результатов, полученных различными методиками, они были приведены в одну систему исчисления (клеток/мкл), с помощью коэффициентов, предложенных производителем программного обеспечения Sysmex Corporation, Япония [3].

Количественный подсчёт элементов мочевого осадка методом оптической микроскопии проводился по общепринятой методике: образец объемом 10 мл центрифугировали при 1500 оборотов/мин в течение 5 мин, отбирали надосадочную жидкость в количестве 9 мл, и в осадке объемом 1 мл ресуспендировали частицы и проводили подсчёт в мочевом слайде при стандартном увеличении [2].

Статистический анализ. Статистическую обработку осуществляли с помощью программы Statistica 10.0 (TIBCO Software Inc, США). Для вычисления параметров рассчитывали среднее и стандартную ошибку среднего ($S \pm m$). Количественное сравнение зависимости выявления форменных элементов при разных методиках подсчёта проводили с помощью расчёта коэффициентов корреляции Пирсона (R), достоверными (значимыми) считались различия при $p < 0,05$. Значимость определялась методом Стьюдента с преобразова-

Таблица 1

Референсные интервалы элементов мочи

Методика исследования	Пол	WBC	RBC	EC	CAST	P.CAST	X'TAIL	SRC
Оптическая микроскопия, количество элементов в поле зрения [6]	М	0–5	0–3	0–5	0–2	-	-	-
	Ж	0–5	0–3	0–5	0–2	-	-	-
Проточная цитофлюориметрия, референсные значения, кл/мкл [7]	М	0–9,2	0–13,1	0–5,7	0–2,3	0–0,5	0–0,3	0–4,1
	Ж	0–39,0	0–30,7	0–45,2	0–2,4	0–0,7	0–0,3	0–6,0

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3, 4 WBC – лейкоциты, RBC – эритроциты, EC – клетки плоского эпителия, CAST – гиалиновые цилиндры, P.CAST – патологические цилиндры, X'TAIL – кристаллы, SRC – переходный и почечный эпителий.

Таблица 2

Показатели количественного исследования элементов мочи ($S \pm m$, кл/мкл), полученные с помощью разных методик подсчёта

Группы и подгруппы	Методика исследования	WBC	RBC	EC	CAST
Группа 1, $n = 200$	Оптическая микроскопия	$7,4 \pm 0,3$	$13,6 \pm 2,6$	$9,0 \pm 0,6$	-
	Проточная цитофлюориметрия	$3,5 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,8$	-
Группа 2, $n = 200$	Оптическая микроскопия	$95,2 \pm 10,0$	$96,5 \pm 12,8$	$38,5 \pm 2,7$	-
	Проточная цитофлюориметрия	$132,1 \pm 10,5$	$70,1 \pm 5,1$	$20,9 \pm 2,0$	-
Группа 3.1, $n = 100$	Оптическая микроскопия	$81,5 \pm 7,1$	$80,1 \pm 5,2$	$27,1 \pm 1,8$	$21,0 \pm 1,4$
	Проточная цитофлюориметрия	$69,9 \pm 5,7$	$117,7 \pm 8,3$	$24,0 \pm 1,4$	$19,4 \pm 1,4$
Группа 3.2, $n = 100$	Оптическая микроскопия	$64,7 \pm 4,9$	$63,3 \pm 5,2$	$31,4 \pm 2,2$	$31,4 \pm 2,5$
	Проточная цитофлюориметрия	$40,5 \pm 3,2$	$83,0 \pm 6,3$	$19,9 \pm 1,7$	$19,0 \pm 1,2$

Корреляционная взаимосвязь количества элементов мочи в разных методиках исследования

Группа	Методика исследования	WBC	RBC	EC	CAST	P'CAST	X'TAIL
1, n = 200	Оптическая микроскопия	0,1	0,7*	0,6*			
	Проточная цитофлюориметрия						
2, n = 200	Оптическая микроскопия	0,8*	0,4*	0,8*			0,3
	Проточная цитофлюориметрия						
3.1, n = 100	Оптическая микроскопия	0,8*	0,7*	0,5*	0,7*	0,6	0,9*
	Проточная цитофлюориметрия						
3.2, n = 100	Оптическая микроскопия	0,7*	0,6*	0,8*	0,5	0,6	0,7
	Проточная цитофлюориметрия						

Примечание. * – статистически достоверная линейная взаимосвязь ($p < 0,05$).

нием Фишера. Статистически достоверные различия средних значений выявлялись U-методом Манна–Уитни и считались значимыми при $p < 0,05$ [8].

Результаты и обсуждение. Результаты настоящего исследования демонстрируют сопоставимые величины по количеству лейкоцитов, эритроцитов, клеток плоского эпителия, кристаллов и малых клеток, внутри групп сравнения (см. табл. 2).

Для подтверждения были рассчитаны ранговые коэффициенты корреляции (R) для количественного содержания лейкоцитов, эритроцитов, клеток плоского эпителия, гиалиновых цилиндров, патологических цилиндров, кристаллов и малых клеток внутри сравниваемых групп (см. табл. 3).

При анализе результатов, полученных в группе здоровых индивидов, установлена статистически достоверная связь высокой и средней силы между содержанием эритроцитов, клеток плоского эпителия. Выявилось отсутствие достоверной линейной взаимосвязи между содержанием лейкоцитов, что обусловлено потерей клеток на этапе центрифугирования, при идеальных условиях составляет до 10% [1]. Также полученный результат может быть связан с тем, что зависимость имеет не линейную природу и распределена по иному закону.

В группе 2 установлена корреляционная взаимосвязь высокой и средней силы между исследуемыми методиками подсчета по количественному содержанию лейкоцитов, эритроцитов и клеток плоского эпителия. Такой результат свидетельствует о достаточной диагностической ценности результатов, полученных на анализаторе SysmexUX-2000.

Анализ результатов в группе 3 представлял большую сложность, так как материал не является однородным по своей структуре и свойствам. Однако данные образцы достаточно часто встречаются в практике работы врача КЛД. Поэтому данную группу разделили на отдельные подгруппы. В группе 3.1 была установлена взаимосвязь высокой и средней силы по таким показателям, как лейкоциты, эритроциты, клетки плоского эпителия, гиалиновые цилиндры, кристаллы, переходный и почечный эпителий. Сопоставимые результаты

получены и при исследовании в группе 3.2, за исключением значений количественного подсчета гиалиновых цилиндров и кристаллов. Не удалось доказать линейную статистически достоверную корреляционную взаимосвязь между содержанием патологических цилиндров, этот факт, возможно, связан со сложностью морфологии этих элементов и соответственно затруднением идентификации при цитофлюориметрическом методе.

Также в этих подгруппах наблюдались достоверные различия средних значений такого показателя, как содержание патологических цилиндров, кристаллов, клеток переходного и почечного эпителия, полученные средние величины могут использоваться как пороговые значения для разделения пациентов по природе патологий почек на этапе скрининга (см. табл. 4) [9].

Выводы

1. В группе пациентов с нормальными показателями нет необходимости в контроле результатов, полученных цитофлюориметрическим методом.

2. В группе пациентов с повышенным содержанием форменных элементов результаты полностью согласуются в исследуемых методиках, соответственно не требуют участия врача в верификации результатов.

3. В группах пациентов с патологическими элементами в моче требуется выполнение исследования методами цитофлюориметрии и оптической микроскопии для получения наиболее достоверных данных.

Финансирование. Работа выполнена в рамках научно-исследовательской апробации (договор №0076/А/МИК/08-16 от 10.08.2016).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Семкина Е.Л., Ходунова Т.В., Каманова Т.С. Оценка потерь лейкоцитов и эритроцитов в моче при центрифугировании с помощью метода проточной урочитометрии. *Справочник заведующего КДЛ*. 2015; 9: 25-7.
- Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник.* Меньшиков В.В., ред. Москва: Медицина; 1987.
- Станкевич Л. И. Опыт применения анализатора мочи UF-1000i Sysmex с технологией проточной цитофлюориметрии: быстрое получение результата, повышение клинической значимости анализа и существенный экономический эффект. *Медицинский алфавит*. 2014; 15 (231): 25-30.
- Morimoto N., Yanai H., Shukuya K., Hitoshi C., Kobayashi K., Matsuno K. Effects of midstream collection and the menstrual cycle on urine particles and dipstick urinalysis among healthy females. *Clin. Chem*. 2003; 49: 188-90.
- Coppens A., Speeckaert M., Delenghe J. The pre-analytical challenges of routine urinalysis. *Acta Clin. Belg*. 2010; 65:182-8.

Пороговые значения ($S \pm m$, кл/мкл) для разделения пациентов по этиологии патологий почек.

Группа	Методика исследования	CAST	P'CAST
3.1, n = 100	Метод оптической микроскопии	19,4 $\pm$ 1,4	4,6 $\pm$ 0,4*
3.2, n = 100	Метод проточной цитофлюориметрии	19,0 $\pm$ 1,2	24,7 $\pm$ 2,7*

Примечание. * – статистически достоверные различия ($p < 0,05$).

6. Кишкун А.А. *Руководство по лабораторным методам диагностики*. М.: ГЕОТАР-Медиа; 2007.
7. Terajima S., Yokomizo H., Yagi A., Miura M., Amano C. Evaluation study for reference intervals of urine sediments using UF-1000i in medical check-up population. *Sysmex J Int*. 2009; 19: 82-6.
8. Елисеева И.И. *Статистика*. М.: Проспект; 2011.
9. Manoni F., Gessoni G., Alessio M.G. Gender's equality in evaluation of urine particles: Results of a multicenter study of the Italian Urinalysis Group. *Clin.Chim.Acta*. 2014; 427: 1-5.
- clinical significance of the analysis and a significant economic effect. *Meditsinskiy alfabvit*. 2014; 15 (3): 25-30. (in Russian)
4. Morimoto N., Yanai H., Shukuya K., Hitoshi C., Kobayashi K., Matsunoi K. Effects of midstream collection and the menstrual cycle on urine particles and dipstick urinalysis among healthy females. *Clin. Chem.* 2003 ; 49: 188-90.
5. Coppens A., Speckaert M., Delenghe J. The pre-analytical challenges of routine urinalysis. *Acta Clin. Belg.* 2010; 65:182-8.
6. Kishkun A.A. *Handbook on laboratory methods of diagnostic [Rukovodstvo po laboratornym metodam diagnostiki]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2007. (in Russian)
7. Terajima S., Yokomizo H., Yagi A., Miura M., Amano C. Evaluation study for reference intervals of urine sediments using UF-1000i in medical check-up population. *Sysmex J Int*. 2009; 19: 82-6.
8. Eliseeva I.I. *Statistics [Statistika]*. Moscow: Prospekt; 2011. (in Russian)
9. Manoni F., Gessoni G., Alessio M.G. Gender's equality in evaluation of urine particles: Results of a multicenter study of the Italian Urinalysis Group. *Clin. Chim.Acta* 2014; 427: 1-5.

REFERENCES

1. Semkina E.L., Chodunova T.V., Kamanova T.S. Evaluation of leukocyte and erythrocyte loss in urine during centrifugation using flow urocytometry. *Spravochnik zaveduyushchego KDL*, 2015; 9: 25-7. (In Russian)
2. *Laboratory methods of research in the clinic [Laboratornye issledovaniya v klinike]*. Spravochnik. Men'shikov V.V., ed. Moscow: Meditsina; 1987. (in Russian)
3. Stankevich L.I. Experience of using the urine analyzer UF-1000i Sysmex with the technology of flow cytofluorometry: rapid results, increased

Поступила 29.11.17
Принята к печати 16.01.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.31-02:613.83]-07:616.316-008.8

Евстратенко В.В.¹, Севбитов А.В.¹, Платонова В.В.¹, Селифанова Е.И.², Дорофеев А.Е.¹

ОСОБЕННОСТИ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ СМЕШАННОЙ СЛЮНЫ У ПАЦИЕНТОВ, УПОТРЕБЛЯЮЩИХ ГЕРОИН И МЕТАДОН

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Москва;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А.Насоновой» РАН, 115522, Москва

По данным многих источников у наркозависимых пациентов значительно возрастают частота и тяжесть различных заболеваний полости рта. Одним из наркотических препаратов, который во многих странах используется в качестве заместительной терапии, является метадон. Однако по последним данным литературы отрицательное воздействие метадона на организм человека в целом более выражено по сравнению с таковым героина. Так, значимость приобретают исследования, результаты которых свидетельствуют о патологических изменениях в органах и системах пациентов, в том числе и о воздействии на ротовую полость. В статье опубликованы результаты исследования кристаллографии биологических жидкостей наркозависимых пациентов, употребляющих героин и метадон. По данным анализа была выявлена зависимость характера роста кристаллов от вида употребляемого наркотика.

Ключевые слова: метадон; героин; наркозависимость; стоматологический статус; кристаллография.

Для цитирования: Евстратенко В.В., Севбитов А.В., Платонова В.В., Селифанова Е.И., Дорофеев А.Е. Особенности кристаллизации смешанной слюны у пациентов, употребляющих героин и метадон. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(4): 223-227. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-223-227>

Evstratenko V.V.¹, Sevbitov A.V.¹, Platonova V.V.¹, Selifanova E.I.², Dorofeev A.E.¹

THE CHARACTERISTICS OF CRYSTALLIZATION OF MIXED SALIVA IN PATIENTS USING HEROIN AND METHADONE

¹The Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The I.M. Sechenov First Moscow State Medical University" of Minzdrav of Russia, 119991, Moscow, Russia

²The Federal State Budget Scientific Institution "The V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology" of the Russian Academy of Sciences, 115522, Moscow, Russia

According many publications, rate and severity of various diseases of oral cavity are significantly increasing in drug-dependent patients. One of drugs using in many countries as a substitution therapy is methadone. However, last research data testifies that negative effect of methadone on human organism in general is more expressed as compared with case of heroin. So, significance is acquired by those studies that testify pathological alterations in organs and systems of patients, including effect on oral cavity. The article presents the results of analysis if crystallography of biological fluids of drug-dependent patients using heroin and methadone. The study established dependence of character of growth of crystals from type of used drug.

Key words: methadone; heroin; drug-dependence; stomatological status; crystallography.

Для корреспонденции: Евстратенко Виктория Викторовна, соискатель учёной степени канд. мед. наук каф. пропедевтики стоматологических заболеваний; e-mail: evstr77@mail.ru

For citation: Evstratenko V.V., Sevbitov A.V., Platonova V.V., Selifanova E.I., Dorofeev A.E. The characteristics of crystallization of mixed saliva in patients using heroin and methadone. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(4): 223-227. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-223-227>

For correspondence: Evstratenko V.V., applicant for scientific degree of candidate of medical sciences of the chair of Propaedeutics of Stomatologic Diseases of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The I.M. Sechenov First Moscow State Medical University", e-mail: evstr77@mail.ru

Information about authors:

Evstratenko V. <http://orcid.org/0000-0002-3589-7888>

Sevbitov A. <http://orcid.org/0000-0002-8247-3586>

Platonova V. <http://orcid.org/0000-0001-5228-6635>

Selifanova E. <http://orcid.org/0000-0002-4242-7059>

Dorofeev A. <http://orcid.org/0000-0002-0815-4472>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 29.11.2017
Accepted 16.12.2017

В связи с высокой диагностической точностью кристаллография в последние десятилетия находит всё большее применение в качестве нового, перспективного метода оценки эффективности проводимого лечения, экологии среды обитания и для уточнения патогенетической сущности заболеваний человека, животных и растений [2, 3].

Эта методика исследования достаточно проста в исполнении и заключается в сравнительном изучении кристаллических структур биологической жидкости у здоровых людей, а также страдающих тем или иным заболеванием. При этом могут использоваться средства свето- и электронно-оптической, поляризационной, люминесцентной, флуоресцентной микроскопии и др. У всех практически здоровых людей кристаллизация ротовой жидкости различная [7]. В большинстве случаев определяют наличие, протяжённость и характер зон кристаллизации, число кристаллизационных центров и характер кристаллического рисунка, фиксируют также форму и ориентацию кристалла (рис. 1, табл. 1). Проведённый сравнительный анализ позволяет выявлять определённые морфотипы кристаллизации, специфичные для различных заболеваний, которые могут быть использованы в дифференциальной диагностике последних [1, 4, 6].

При наличии того или иного заболевания изменения морфотипа кристаллизации биологической жидкости обычно характеризуются нарушениями ориентировки кристаллических структур, что проявляется разнообразием вторичных форм кристаллов (ромбовидные, игольчатые, кустовидные, дендровидные, атипичные). Могут наблюдаться также и разные степени отсутствия структурирования, от частичного до полного [5, 7].

Материал и методы. В современных научных источниках имеется большое количество информации о патологическом воздействии метадона на организм. Поражается центральная нервная система, страдают органы желудочно-кишечного тракта, значительно снижается иммунная защита [4]. Нами было проведено исследование, в ходе которого осмотрено 197 пациентов в возрасте от 20 до 50 лет и более, 102 мужчины и 95 женщин, находящихся в реабилитационном периоде. При осмотре определено, что все 100% пациентов остро нуждаются в различных видах стоматологической помощи. Выявлено также, что ранние обращения этих пациентов к стоматологу мотивированы развитием болевого синдрома, причём обращались в основном к хирургу-стоматологу с целью удаления не подлежащего лечению зуба или вскрытия абсцесса. Плановая санация полости рта не проводилась, как правило, из-за проблем адаптации к стоматологическому лечению и боязни боли, а также в связи с различными жизненными ограничениями, обусловленными приёмом наркотиков и длительностью этапов стоматологического лечения [4, 6].

Из 197 осмотренных пациентов мы выбрали тех, которые кроме героина не принимали других наркотических препаратов (53 пациента) и тех, которые в качестве заместительной терапии различный период времени получали метадон (57 пациентов). При оценке кристаллограмм это был основной признак, по которому распределяли пациентов.

В исследовании использовали смешанную слюну, т. е. секрет всех слюнных желез (ротовая жидкость). Материал собирали до еды, натощак. Использовали фоновую (нестимулированную) слюну.

Пациенту до забора материала на исследование не реко-

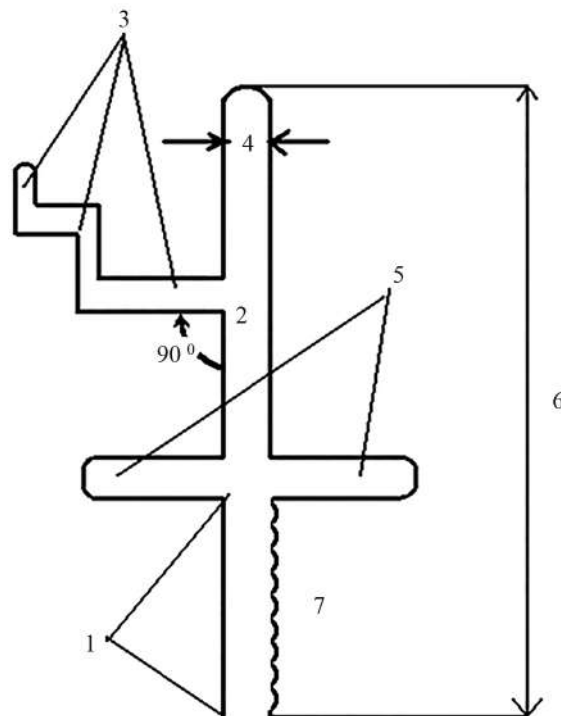


Рис. 1. Схема описания кристаллов слюны при большом увеличении у практически здоровых людей.

1-LTB- длина кристалла до места «ветвления»; 2-ANG – угол ветвления; 3 – CLO- число поколений ветвлений (1-го, 2-го порядка и др.); 4 –BRE- ширина кристалла; 5 –ASS- асимметрия ветвления: есть – 1, нет – 2; 6 – LEN – длина кристалла; 7- PDS- число микроотростков по длине кристалла.

Таблица 1

Классификация морфологических признаков кристаллических агрегатов смешанной слюны у практически здоровых людей

Шифр	Описание
Количественные признаки	
LTB	Длина кристалла до места «ветвления», мм
ANG	Угол ветвления, градус
CLO	Число поколений ветвлений 1-го, 2-го порядка и др., ед.
BRE	Ширина кристалла, ед.
LEN	Длина кристалла, мм
PDS	Число микроотростков по длине кристалла, ед.
Качественные признаки	
CFN	Неравномерность толщины на протяжении одной фигуры
AS2	Асимметрия ветвления: наличие симметричных и асимметричных отростков есть – 1, нет – 2
FCD	Стержни без ветвлений, с длинными микроотростками
ASS	Асимметрия ветвления: есть – 1, нет – 2
CRO	Искривление основного «ствола» кристалла
CFM	Появление кристаллов с размытыми контурами
CFF	Форма кристаллов – «плоский» кристалл
CFS	Изменения деформирующего и деструктивного порядка – септированные (расщеплённые) концы
FCT	Стержни без ветвлений, с треугольными микроотростками
CRE	Крестообразные кристаллы

мендовали курение, чистку зубов, обильное питье или полоскание рта.

Полученные образцы наносили на поверхность подложки (поверхность для высыхания биожидкости) каплей объёмом 0,1 мм. Строго в горизонтальном положении высушивали при температуре 18–25°C. После высыхания исследовали структуру слюны, используя оптический микроскоп Leica DM-LS (Германия) с видеокамерой Sony-DC30P. Полученное изображение передавалось на экран монитора. При малом увеличении сканировалось изображение всей поверхности высушенной капли, затем при большем увеличении исследовались отдельные участки её поверхности.

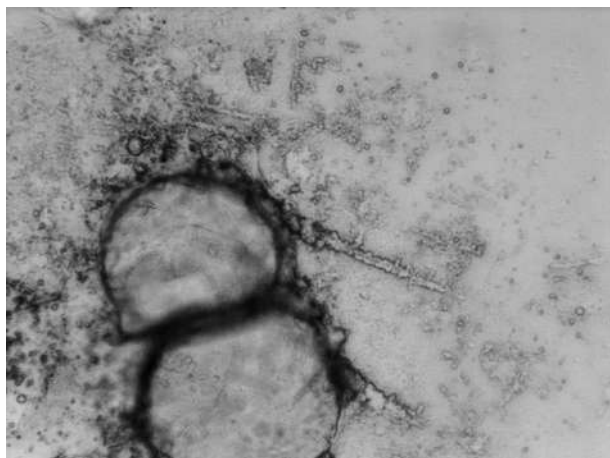


Рис. 2. Игольчатые короткие отростки CAN. Отсутствие роста кристалла.

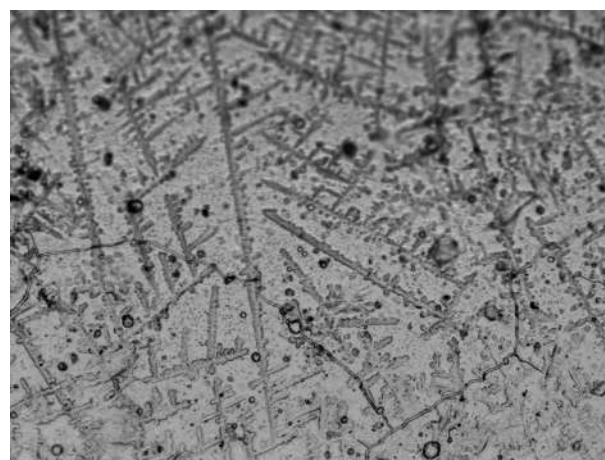


Рис. 3. Игольчатые, короткие отростки CAN. Одностороннее ветвление CUM. Полное отсутствие ветвления FAB.



Рис. 4. Отсутствие вершины кристалла (отросток 1-го поколения отходит от вершины кристалла) CWT. ASS – есть.

Выбранные участки кристаллограммы записывались на компьютер в виде графического файла, для обработки изображения использовались программы Adobe Photoshop 6.0 и PhotoDraw 2000. Полученные данные заносились в электронную таблицу Excel 2000 из пакета Microsoft Office 2000 SR-1 и анализировались с учётом статистических пакетов Statistica-5.0 и StatgraphicsPlus 5.

Для оценки нулевой гипотезы был использован *t*-критерий Стьюдента. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты. В ходе исследований получены сравнительные характеристики структур и качественных признаков кристаллограмм агрегатов смешанной слюны пациентов, употребляющих героин и метадон.

Цифровые стандартизированные изображения кристаллограмм слюны героинзависимых пациентов содержат, как правило, признаки отсутствия роста кристалла, отмечаются также короткие игольчатые отростки CAN, одностороннее ветвление CUM, отсутствие вершины кристалла и ветвления FAB, отходы отростков 1-го поколения от вершины кристалла CWT, асимметрия ветвления ASS и неравномерность толщины на протяжении одной фигуры CFN (рис. 2–5).

Анализ кристаллограмм слюны пациентов, употребляющих метадон, показал, что основным отличительным признаком их является разрыв структуры CGS, при этом в ряде случаев наблюдаются асимметрия ветвления ASS, отсутствие

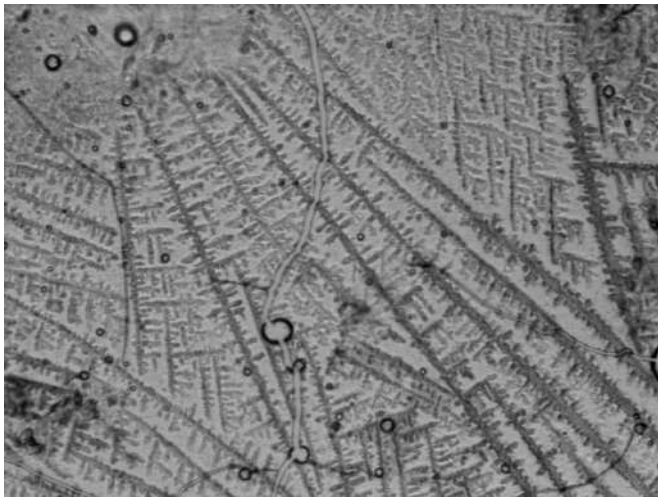


Рис. 5. Длинные, тонкие с короткими отростками, ASS – есть. Неравномерность толщины на протяжении одной фигуры CFN.

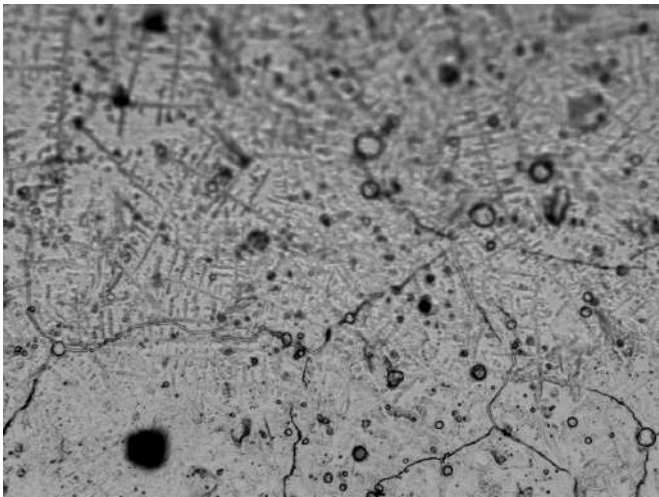


Рис. 7. Кристалл с разрывом структуры CGS. ASS – есть.

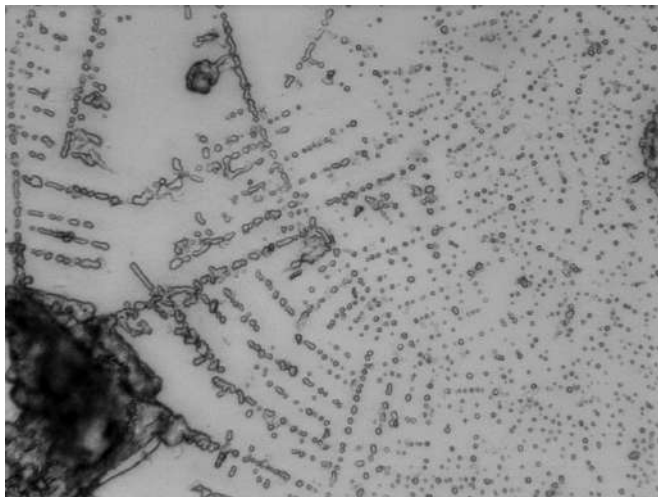


Рис. 6. Кристалл с разрывом структуры CGS. Отсутствие вершины кристалла (отросток 1-го поколения отходит от вершины кристалла) CWT.



Рис. 8. Кристалл с разрывом структуры CGS.

Таблица 2

Качественные признаки кристаллограмм агрегатов смешанной слюны у обследованных пациентов

Паци- ент	Признаки							
	CAN	CGS	CWT	GSM	ASS	CUM	FAB	CFN
Г1	+			+				
Г2		+		+	+			
Г3	+					+	+	
Г4			+		+	+		
Г5					+			+
М1		+	+					
М2		+			+			
М3		+			+			
М4		+	+					
М5		+		+				

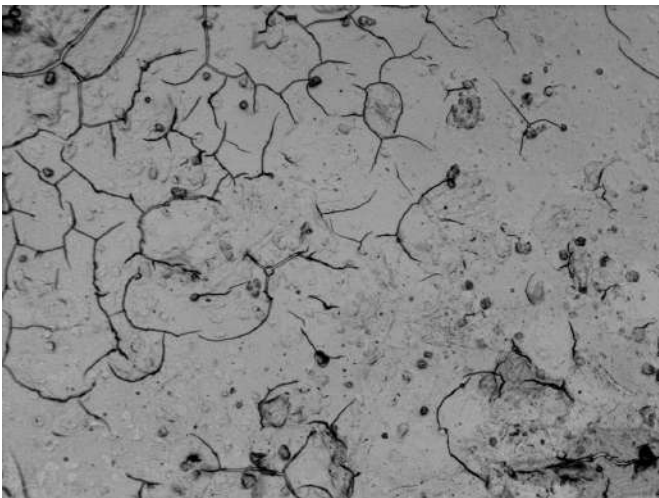


Рис. 9. Кристалл с разрывом структуры CGS.

вершины кристалла и отходы отростков 1-го поколения от вершины кристалла CWT (рис. 6–9).

Качественные признаки кристаллограмм агрегатов смешанной слюны для выборки из 5 пациентов, употребляющих героин (Г1–Г5), и 5 пациентов, употребляющих метадон (М1–М5), представлены в табл. 2.

Обсуждение. В настоящей работе представлены результаты исследования по разработке нового критерия диагностики для оценки фигур кристаллизации слюны у наркозависимых пациентов, употребляющих героин и метадон. Прием наркотических веществ оказывает влияние на гомеостаз слюнных желез. Используя в качестве показателей морфологические особенности кристаллов, образующихся при высушивании ротовой жидкости, провели сравнение кристаллизации слюны у практически здоровых людей (контрольная группа) и пациентов, употребляющих героин и метадон.

При этом изучена возможность дифференциации пациентов, употребляющих героин и метадон, по морфологическим особенностям кристаллограмм. Метод позволяет исследовать процессы в физиологических условиях без повреждения тканей, что является важным для адекватной оценки и правильной интерпретации наблюдаемых явлений.

Заключение. Имеются различия в структуре кристаллизации у пациентов, употребляющих героин и метадон. У наркозависимых пациентов, употребляющих метадон, четко определяется кристалл с разрывом структуры CGS, а у пациентов, употребляющих героин, визуализируется отсутствие роста кристалла. В литературе данных о разнице в кристаллизации биологических жидкостей у пациентов, употребляющих героин и метадон, нами обнаружено не было. Эти изменения в морфологии кристаллов обнаружены впервые. Ранее подобные исследования не проводились у наркозависимых пациентов; результаты таких исследований могут использоваться в целях диагностики.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барер Г.М., Денисов А.Б., Стурова Т.М. Вариабельность кристаллических агрегатов ротовой жидкости в норме. *Российский стоматологический журнал*. 2003; 1: 33-5.
2. Кидалов В.Н., Хадарцев А.А. *Тегиография крови и биологических жидкостей*. Хадарцев А.А., ред. Тула: Тульский полиграфист; 2009.
3. Кидалов В.Н., Муромцев В.А., Куликов В.Е. Информационное

значение тегиографических исследований биологических жидкостей. *Международный информационный бюллетень «Международная академия»*. 1999; 10-12: 104-7.

4. Мартусевич А.К., Воробьев А.В., Гришина А.А., Русских А.П. Физиология и патология кристаллостаза: общая парадигма и перспективы изучения. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского*. 2010; 1: 135-9.
5. Митин Н.Е., Тихонов В.Э., Гришин М.И. Исследование мотивационных предпосылок к стоматологическому лечению для улучшения качества жизни. *Стоматология для всех*. 2015; 4: 46-7.
6. Мячина О.В., Зуйкова А.А., Пашков А.Н., Пичужкина Н.М. Морфологические особенности кристаллографии секретов больших слюнных желез. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2015; 4 (3): 86-7.
7. Денисов А.Б., Барер Г.М., Селифанова Е.И. Кристаллизация компонентов ротовой жидкости у больных сахарным диабетом 1-го типа. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2005; 139(1): 22-4.

REFERENCES

1. Barer G.M., Denisov A.B., Sturova T.M. Variability of crystalline aggregates of oral fluid under normal conditions. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal*. 2003; 1: 33-5. (in Russian)
2. Kidalov V.N., Khadartsev A.A. *Teziography of blood and biologic fluids [Teziografiya krovi i biologicheskikh zhidkostey]*. Khadartsev A.A., ed. Tula: Tul'skiy poligrafist. 2009. (in Russian)
3. Kidalov V.N., Muromtsev V.A., Kulikov V.E. Informational significance of teziographic study of biologic fluids. *Mezhdunarodnyi informatsionnyy byulleten' «Mezhdunarodnaya akademiya»*. 1999; 10-12: 104-7. (in Russian)
4. Martusevich A.K., Vorob'yov A.V., Grishina A.A., Russkikh A.P. Physiology and pathology of cristalostasis: general paradigm and prospects of study. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I.Lobachevskogo*. 2010; 1: 135-9. (in Russian)
5. Mitin N.E., Tikhonov V.E., Grishin M.I. Study of motivational preconditions for dental treatment for improvement of life quality. *Stomatologiya dlya vsekh*. 2015; 4: 46-7. (in Russian)
6. Myachina O.V. Zuykova A.A., Pashkov A.N., Pichuzhkina N.M. Morphologic distinctive features of crystallography of secretions of major salivary glands. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2015; 4 (3): 86-7. (in Russian)
7. Denisov A.B., Barer G.M., Selifanova E.I. Crystallization of oral fluid components in patients with diabetes mellitus type 1. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2005; 139 (1): 22-4. (in Russian)

Поступила 29.11.17

Принята к печати 16.12.17

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.155.392-036.11-074:681.5

Мининкова А.И.^{1,2}, Луговская С.А.¹, Почтарь М.Е.¹, Хуажева Н.К.², Тлевцежева А.А.², Воробьев В.И.², Лаврентьев И.С.², Емельянова Э.Б.², Долгов В.В.¹

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО АНАЛИЗА КРОВИ

¹Кафедра клинической лабораторной диагностики ФГБУЗ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ, 125284, Москва;

²ГБУЗ «Городская клиническая больница им С.П.Боткина» ДЗМ, 125284, Москва

Лейкозы – опухолевые клональные заболевания кроветворной системы с первичным поражением костного мозга. Современные технологии автоматизированного анализа крови позволяют проводить быстрый первичный скрининг патологических образцов крови, подозрительных на присутствие бластных клеток. Использование разных методов исследования с целью обнаружения бластных клеток (оптического, цитохимического, иммунофенотипического) демонстрирует их различное распределение на графиках.

Ключевые слова: бластные клетки; гематологический анализатор; моноклональные антитела.

Для цитирования: Мининкова А.И., Луговская С.А., Почтарь М.Е., Хуажева Н.К., Тлевцежева А.А., Воробьев В.И., Лаврентьев И.С., Емельянова Э.Б., Долгов В.В. Диагностический скрининг острых лейкозов с использованием новых технологий автоматизированного анализа крови. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (4): 228-233. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-228-233>

Mininkova A.I.^{1,2}, Lugovskaya S.A.¹, Pochtar M.E.¹, Khuazheva N.K.², Tlevtsezheva A.A.², Vorobiev V.I.², Lavrentiev I.S.², Emel'yanova E.B.², Dolgov V.V.¹

THE DIAGNOSTIC SCREENING OF ACUTE LEUKEMIA USING NEW TECHNOLOGIES OF AUTOMATED BLOOD ANALYSIS

¹The Federal State Budget Educational Institution of Additional Professional Education "The Russian Medical Academy of Post-Graduate Education" of Minzdrav of Russia, 123995, Moscow, Russia

²The State Budget Institution of Health Care "The S.P. Botkin Municipal Clinical Hospital" of the Moscow Health Care Department, 125284, Moscow, Russia

The leukemia is a neoplastic clonal disease of hematopoietic system with primary affection of bone marrow. The modern technologies of automated blood analysis permit to implement a quick primary screening of pathological samples of blood suspicious for presence of blast cells. The application of various analysis techniques (optical, cytochemical, immune phenotypical) with the purpose of detecting blast cells demonstrates their different distribution at the graphics.

Key words: blast cells; hematological analyzer; monoclonal cells.

For citation: Mininkova A.I., Lugovskaya S.A., Pochtar M.E., Khuazheva N.K., Tlevtsezheva A.A., Vorobiev V.I., Lavrentiev I.S., Emel'yanova E.B., Dolgov V.V. The diagnostic screening of acute leukemia using new technologies of automated blood analysis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(4): 228-233. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-228-233>

For correspondence: Mininkova A.I., physician of the Federal State Budget Educational Institution of Additional Professional Education "The Russian Medical Academy of Post-Graduate Education" and the State Budget Institution of Health Care "The S.P. Botkin Municipal Clinical Hospital", e-mail: koann@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 13.01.2018
Accepted 25.01.2018

Лейкозы – опухолевые клональные заболевания кроветворной системы с первичным поражением костного мозга. На долю острых лейкозов (ОЛ) приходится 3% всех злокачественных новообразований. Заболеваемость ОЛ составляет в среднем 3–5 случаев на 100 тыс. населения в год [1], в 75% наблюдений ОЛ диагностируется у взрослых лиц.

Для корреспонденции: Мининкова Анна Игоревна, врач КДЛ, ГБУЗ ГКБ им С.П.Боткина ДЗМ; e-mail: koann@mail.ru

Диагностика ОЛ включает исследование периферической крови, аспирата и трепанобиоптата костного мозга. В миелограмме отмечается увеличение бластных клеток (в соответствии с рекомендациями ВОЗ – более 20%) с одновременным угнетением пролиферации элементов эритропоэза и мегакариопоэза [2, 3]. С целью установления варианта острого лейкоза, кроме морфологической оценки, проводится ряд дополнительных исследований: цитохимический анализ бластов, иммунофенотипирование методом проточной цитометрии.

Таблица 1

Распределение клеток по популяциям в зависимости от активности МПО*

Тип клеток	Активность МПО, величина клеточной абсорбции
Миелобласты	-, иногда ½+ (миелобласты)
Промиелоциты	3
Миелоциты	3+
Метамиелоциты	3+
Палочкоядерные нейтрофилы	2–3+
Сегментоядерные нейтрофилы	2+
Эозинофилы	4+
Базофилы	½–1+
Лимфобласты	-
Пролимфоциты	-
Лимфоциты	-
Большие гранулярные лимфоциты	-
Монобласты	-
Промоноциты	½–1+
Моноциты	1+
Плазматические клетки	-
Нормобласты	-

Примечание. Представлены данные руководства к гематологическому анализатору ADVIA 2120/2120i [5]; * – степени градации активности МПО: ½+ – очень низкая, 1+ – низкая, 2+ – средняя, 3+ – высокая, 4+ – очень высокая.

трии, цитогенетическое/молекулярно-генетическое исследование. В зависимости от направленности дифференцировки клеток-предшественников выделяют острые лимфобластные, миелобластные и лейкозы смешанной линейности.

Целью данной работы является оценка возможностей современных технологий автоматизированного анализа крови выявления бластных клеток.

Материал и методы. В период с апреля по июнь 2017 г. проведены исследования у 27 пациентов 6-го гематологического отделения ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» с первично выявленным ОЛ. Для верификации диагноза больных выполняли морфологическое, цитохимическое исследование костного мозга, иммунофенотипирование и цитогенетический анализ. У 3 пациентов диагноз ОЛ был установлен по результатам морфологического и цитохимического исследования периферической крови. В связи со смертью больных анализ костного мозга был невозможен. Диагноз острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) установлен у 16 пациентов (9 женщин и 7 мужчин) в возрасте от 35 до 79 лет. У 8 больных (4 женщины, 4 мужчины, возраст 31 – 80 лет) верифицирован диагноз острого миеломонобластного лейкоза (ОММЛ). У 3 больных (2 женщины, 1 мужчина, возраст 30 – 74 года) выявлен острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ): у 2 больных – В-ОЛЛ, у одного – Т-ОЛЛ.

У всех больных исследовалась периферическая венозная кровь, взятая натощак в вакуумные пробирки с антикоагулянтом с К₂-ЭДТА производства фирмы «Becton Dickinson». Общий анализ крови проводился на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/2120i («Siemens», Германия). Цитохимическое определение числа позитивных к миелопероксидазе (МПО) бластных клеток осуществлялось с использованием наборов Диахим-Цитостейн-МПО производства «НПФ-Абрис+». Кроме того, кровь исследовалась методом проточной цитометрии с использованием набора моноклональных антител CYTODIFF™ на приборе Cytomics FC500 («Beckman Coulter», США). Референсным методом обнаружения бластов являлась световая микроскопия.

Современные гематологические 5-diff-анализаторы позволяют проводить дифференцировку лейкоцитов по 5 основным популяциям: нейтрофилам, базофилам, эозинофилам, лимфоцитам и моноцитам, используя оптические, электрические, цитохимические методы. Так, на приборах ADVIA 120, 2120, 2120i фирмы «Siemens» разделение лейкоцитов на субпопуляции осуществляется в зависимости от содержания в них МПО (определяется по величине клеточной абсорбции; распределение клеток по активности в них МПО приведено в табл. 1) и их размера (определяется по величине прямого светорассеивания). Для выявления МПО в клетках используется краситель 4-хлор-1-нафтол, который, взаимодействуя с перекисью водорода, образует соединение, вступающее в реакцию с МПО [4, 5]. Полученные результаты дифференцировки клеток представляются в виде скатерограммы распределения лейкоцитов, где по оси X отражено содержание в клетках МПО, а по оси Y – размеры клеток (рис. 1, см. обложку).

Помимо классических 5 популяций лейкоцитов на скатерограмме выделяется так называемая LUC (large unstained cells) область, обозначенная цифрой 5 (см. рис. 1). В этот регион попадают большие, МПО-негативные клетки. По данным литературы, в этой области находятся бластные клетки, большие гранулярные лимфоциты и/или другие крупные пероксидазонегативные клетки [4–7]. Кроме того, гематологический анализатор ADVIA 2120/2120i сигнализирует о появлении этих клеток морфологическими флагами АТYP (большие гранулярные, атипичные лимфоциты) и BLASTS. Флаг АТYP возникает, когда значение % LUC ≥ 4,5, и % LUC превышает значение % BLASTS в 1,5 раза и более. Флаг BLASTS появляется, если % BLASTS составляет 1,5–5 и % LUC > 4,5% или % BLASTS > 5,0% от общего количества лейкоцитов. По

данным М. Depoorter [6], появление флага BLASTS на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/2120i свидетельствует о наличии бластных клеток с чувствительностью 84% и специфичностью 75%. Результаты исследования S.G. Shelat и соавт. [8] подтвердили высокую чувствительность анализатора относительно выявления бластов (по их данным, 100%), однако специфичность метода составила 49%. Также одним из морфологических флагов прибора является флаг IG. Данный флаг свидетельствует о появлении в крови пероксидазоактивных, моноядерных клеток, к которым можно отнести промиелоцит, миелоцит, метамиелоцит и палочкоядерный нейтрофил. Флаг IG возникает в том случае, если [(% нейтрофилов + % эозинофилов) - % полиморфно-ядерных клеток] ≥ 5 [5].

Проточная цитометрия позволяет быстро и надёжно определить линейную принадлежность бластов с помощью моноклональных антител к различным антигенам дифференцировки миелоидной и лимфоидной направленности. Набор CYTODIFF™ («Beckman Coulter», США) предназначен для дифференциального подсчёта лейкоцитов и представляет собой 5-цветный коктейль из 6 моноклональных антител CD36-FITC/CD2-PE + CD294 (CRTH2)-PE/CD19-ECD/CD16-Cy5/CD45-Cy7, который позволяет подсчитать 17 клеточных популяций. Помимо стандартных популяций лейкоцитов (нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, эозинофилы, базофилы) определяются дополнительные клеточные популяции – В-, Т-, NK-лимфоциты, незрелые гранулоциты и бластные клетки. Кроме того, определяется содержание CD16-позитивных и негативных моноцитов, CD16 – позитивных и негативных Т- и NK-лимфоцитов. Бластные клетки выделяются в регионах, обозначенных как Xt (Т-бласты), Xb (В-бласты), Xn (ни Т-, ни В-бласты), Xm (монобласты). Для выделения всех вышеуказанных популяций в проточном цитометре Cytomics FC500 («Beckman Coulter») ис-

пользуется программа автоматического гейтирования клеточных популяций (программа CytoDiff CXP 2.0, «Beckman Coulter», США). По данной методике у каждого пациента проводится анализ около 20 000 лейкоцитов, что значительно увеличивает точность подсчёта по сравнению с ручным методом дифференцировки лейкоцитов под микроскопом. Если при дифференциальном подсчёте лейкоцитов определяется суммарно менее 1% бластных клеток, данный образец крови считается CytoDiff-бластнегативным. Если хотя бы 1 тип бластов превышает 1%, данный образец крови считается CytoDiff-бластопозитивным. При обнаружении более 2 типов бластов, превышающих 1%, используется сумма выявленных бластных клеток для итогового их количества [9]. По данным J. Kahng и соавт. [9], метод CYTODIFF™ обладает высокой чувствительностью (94,4%) и специфичностью (91,9%) и хорошо коррелирует с ручным подсчётом бластных клеток ($r = 0,922$).

Исследования крови пациентов проводились в динамике течения и терапии ОЛ. До начала терапии они выполнялись неоднократно, и общее количество исследованных образцов крови в группе больных ОМЛ составило 64, в группе ОММЛ – 27, в группе ОЛЛ – 5.

Поскольку распределение клеток по популяциям в гематологическом анализаторе ADVIA 2120/2120i зависит от интенсивности МПО, 24 пациентам с ОМЛ и ОММЛ было проведено цитохимическое исследование МПО в бластных клетках, по результатам которого все пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от активности МПО (% МПО-позитивных клеток). В 1-ю группу включены 15 пациентов (10 с ОМЛ, 5 с ОММЛ), имеющих число МПО-позитивных бластов до 29% (53 исследованных образца крови). Во 2-ю группу вошли 4 пациента (3 с ОМЛ, 1 с ОММЛ) с количеством МПО-позитивных бластов от 30 до 65% (16 исследованных образцов крови). Пять пациентов (3 с ОМЛ, 2 с ОММЛ) были объединены в 3-ю группу, где процент МПО-позитивных бластных клеток превышал 65% (22 исследованных образца крови). Трёх больных ОЛЛ анализировали в отдельной группе. Распределение пациентов с ОМЛ и ОММЛ по группам представлено в табл. 2.

При исследовании крови 24 пациентов с ОМЛ и ОММЛ на проточном цитометре с использованием реагента CYTODIFF™ было выделено 2 группы в зависимости от вида лейкоза. Первую группу составили 15 больных ОМЛ (56 исследованных образцов крови), вторую – 9 пациентов с ОММЛ (23 исследованных образца крови). Трёх больных ОЛЛ анализировали отдельно.

Для анализа полученных данных использовали непараметрический корреляционный тест Спирмена, рассчитывали коэффициенты корреляции между различными методами (r_s), уравнения линейной регрессии. Для статистического анализа результатов исследования использовали программу GraphPad Prism («GraphPad Software, Inc.», США).

Результаты. Полученные данные и результаты их статистической обработки приведены на рис. 2 и 3. На диаграмме корреляции процента бластных клеток с параметрами гематологического анализатора ADVIA 2120/2120i (% LUC и % моноцитов (Моно)) у больных ОМЛ и ОММЛ (см. рис. 2) цельной линией изображена линия регрессии, двумя пунктирными линиями – 95% доверительный интервал. В левом верхнем углу графиков даны компоненты математического анализа регрессии: уравнение линейной регрессии ($y = x$), коэффициент корреляции Спирмена (r_s) объём выборки (n). На графиках 1А, 1В представлены данные о больных с количеством МПО-позитивных бластов от 0 до 29%, на графиках 2А, 2В – от 30 до 65% и на графиках 3А, 3В – свыше 65%. Все графики с индексом А (1А, 2А, 3А) иллюстрируют зависимость между % бластов, подсчитанных ручным методом, и параметром % LUC гематологического анализатора ADVIA 2120/2120i. В то же время графики с индексом В (1В, 2В, 3В)

Таблица 2

Распределение пациентов с ОМЛ и ОММЛ по группам в зависимости от % МПО-позитивных бластов, выявленных цитохимическим методом

Показатель	Пациенты с ОМЛ и ОММЛ (n = 24)		
	1-я группа (n = 15)	2-я группа (n = 4)	3-я группа (n = 5)
% МПО-позитивных бластов (цитохимический метод)	0–29	30–65	> 65
Число исследованных образцов крови на анализаторе ADVIA 2120/2120i	53	16	22

характеризуют зависимость между % бластов, подсчитанных ручным методом, и относительным количеством моноцитов, полученным на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/2120i.

На диаграмме корреляции процента бластных клеток с параметрами проточного цитометра Cytomics FC500 (% Xn, % Моно, % [Xn + Моно]) у больных ОМЛ и ОММЛ цельной линией изображена линия регрессии, двумя пунктирными линиями – 95% доверительный интервал. В левом верхнем углу графиков даны компоненты математического анализа регрессии: уравнение линейной регрессии ($y = x$), коэффициент корреляции Спирмена (r_s), объём выборки (n). Графики 4А, 4В, 4С в левой части рисунка и 4D, 4Е, 4F в правой части рисунка иллюстрируют зависимость между количеством бластов, полученных при световой микроскопии, и параметрами проточного цитометра (% Xn, % Моно, % [Xn + Моно]) у больных ОМЛ (слева) и ОММЛ (справа).

Обсуждение. При изучении распределения бластных клеток на скатерограмме гематологического анализатора ADVIA 2120/2120i в 1-й группе больных выявлена наибольшая корреляция % бластов, подсчитанных ручным методом, с параметром % LUC ($r_s = 0,759$). Во 2-й группе больных бласты коррелировали как с % LUC ($r_s = 0,854$), так и с % моноцитов ($r_s = 0,621$) гематологического анализатора. При анализе 3-й группы больных выявлено, что бластные клетки не попадают в область LUC ($r_s = 0,021$), а распределяются в области моноцитов ($r_s = 0,752$). У одного пациента с 100% активностью МПО все бласты попали в регион нейтрофилов. Следует отметить, что когда бласты распределяются в области нейтрофилов вследствие высокой МПО-активности, прибор выдает морфологический флаг IG. Однако у данных пациентов при морфологическом исследовании мазка крови незрелые гранулоциты не выявлялись, что позволило констатировать факт локализации бластных клеток в области незрелых гранулоцитов.

Таким образом, нами сделан вывод, что с увеличением процента МПО-позитивных бластов бластные клетки локализуются на скатерограмме не в LUC-области (МПО-), а попадают в регион моноцитов (МПО+) и/или нейтрофилов (МПО+++). На рис. 4 (см. обложку) представлены скатерограммы распределения лейкоцитов пациентов с ОМЛ и ОММЛ. Наличие менее 30% МПО-позитивных бластов в крови регистрируется прибором в зоне LUC (рис. 4, а), более 30% – в регионе моноцитов (рис. 4, б), более 65% – в области нейтрофилов (рис. 4, в).

В группе ОЛЛ проанализировано 3 пациента (5 исследованных образцов крови). У 2 пациентов с верифицированным В-ОЛЛ бластные клетки распределились между LUC-областью и лимфоцитами (рис 5, а, см. обложку). У 1 пациента с установленным диагнозом Т-ОЛЛ на скатерограмме все бластные клетки попали в зону расположения лимфоцитов

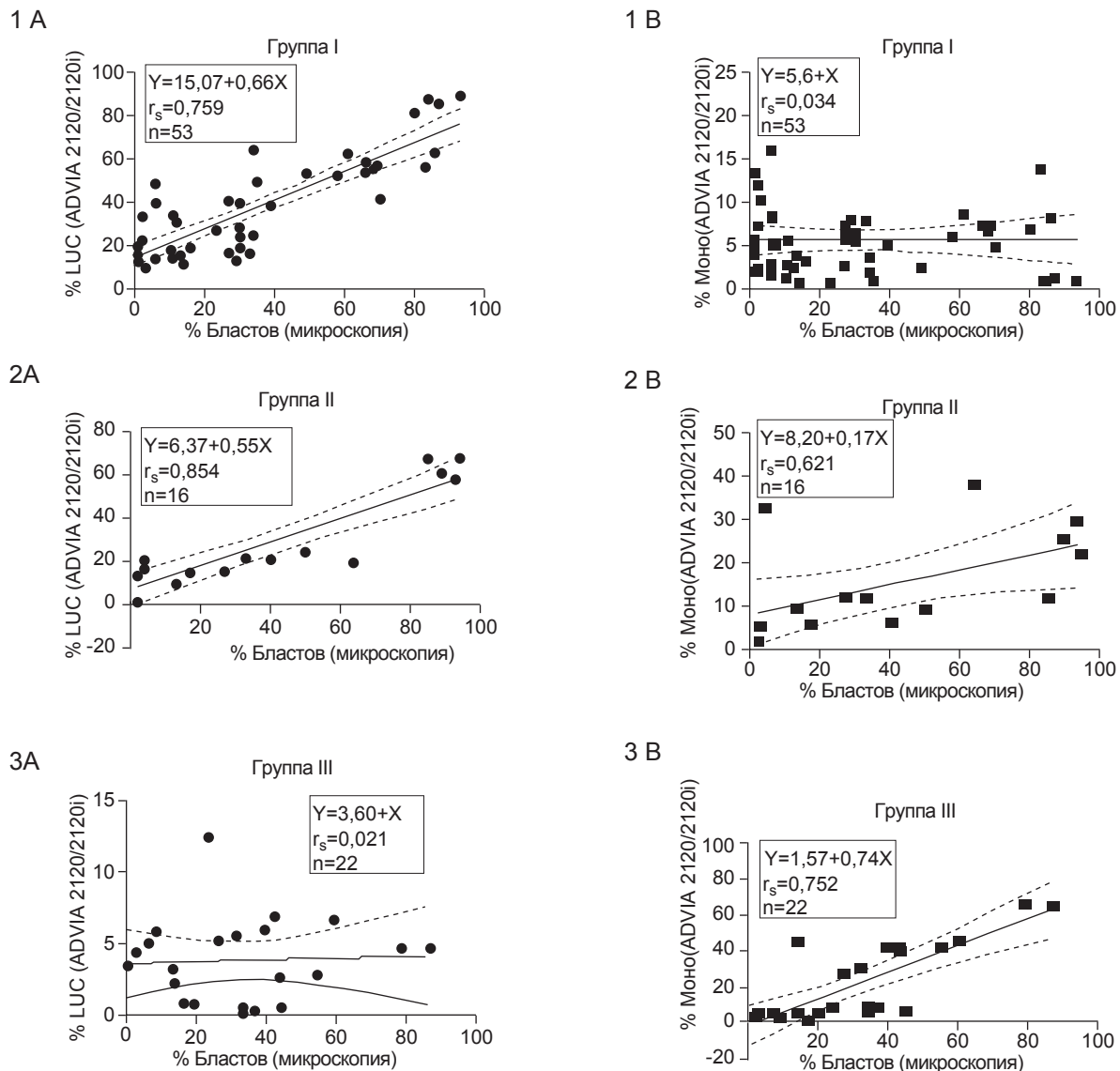


Рис. 2. Диаграммы корреляции процента бластных клеток с параметрами гематологического анализатора ADVIA 2120/2120i (% LUC и % Моно) у больных ОМЛ и ОММЛ по группам.

(рис. 5, б, см. обложку). При морфологическом исследовании мазка крови бласты представляли собой клетки размером 6–8 мкм с тонким ободком цитоплазмы, что, вероятно, не позволило прибору отнести их к LUC-клеткам, которые представляют собой объекты более крупного размера.

Анализ цитометрических данных, полученных на Cytomics FC500, показал, что у всех пациентов с ОМЛ бластные клетки регистрировались в области Xn-бластов (миелобластов) ($r_s = 0,784$) (рис. 6, а, б, см. обложку).

При ОММЛ бласты распределялись между регионом Xn-бластов (миелобластов) и областью моноцитов (рис. 7, а, б, в, см. обложку). Наибольшая корреляция наблюдается между бластными клетками и суммарным количеством моноцитов и Xn-бластов ($r_s = 0,649$). Морфологическое исследование мазков крови показало, что число моноцитов оставалось в пределах нормы, в то время как количество моноцитов при дифференциальном подсчете лейкоцитов с использованием реагента CYTODIFF™ было увеличено. У одного пациента все бластные клетки локализовались в области Xn-бластов (монобластов).

Анализ 2 больных с установленным В-ОЛЛ показал распределение бластных клеток между Xb- и Xn-областью с основной локализацией в зоне Xb-бластов (рис. 8, а, б, см. обложку). Вероятно, в данном случае необходимо использовать сумму бластных клеток для определения итогового их количества [5]. У больного Т-ОЛЛ бластные клетки попали в два бластных региона, Xb и Xt, с преимущественным расположением в Xt-регионе. (рис. 9, а, б, см. обложку).

Подводя итог вышесказанному, необходимо отметить, что использование разных методов исследования с целью обнаружения бластных клеток (оптического, цитохимического, иммунофенотипического) демонстрирует различное их распределение на графиках. Так, увеличение только LUC-клеточной популяции на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/2120i при наличии морфологически установленных бластов позволяет предположить у больного ОМЛ с количеством МПО-позитивных бластов менее 30%. Увеличение процентного содержания как LUC-клеток, так и моноцитов при наличии морфологически установленных бластов и отсутствии увеличения количества моноцитов при визуальной

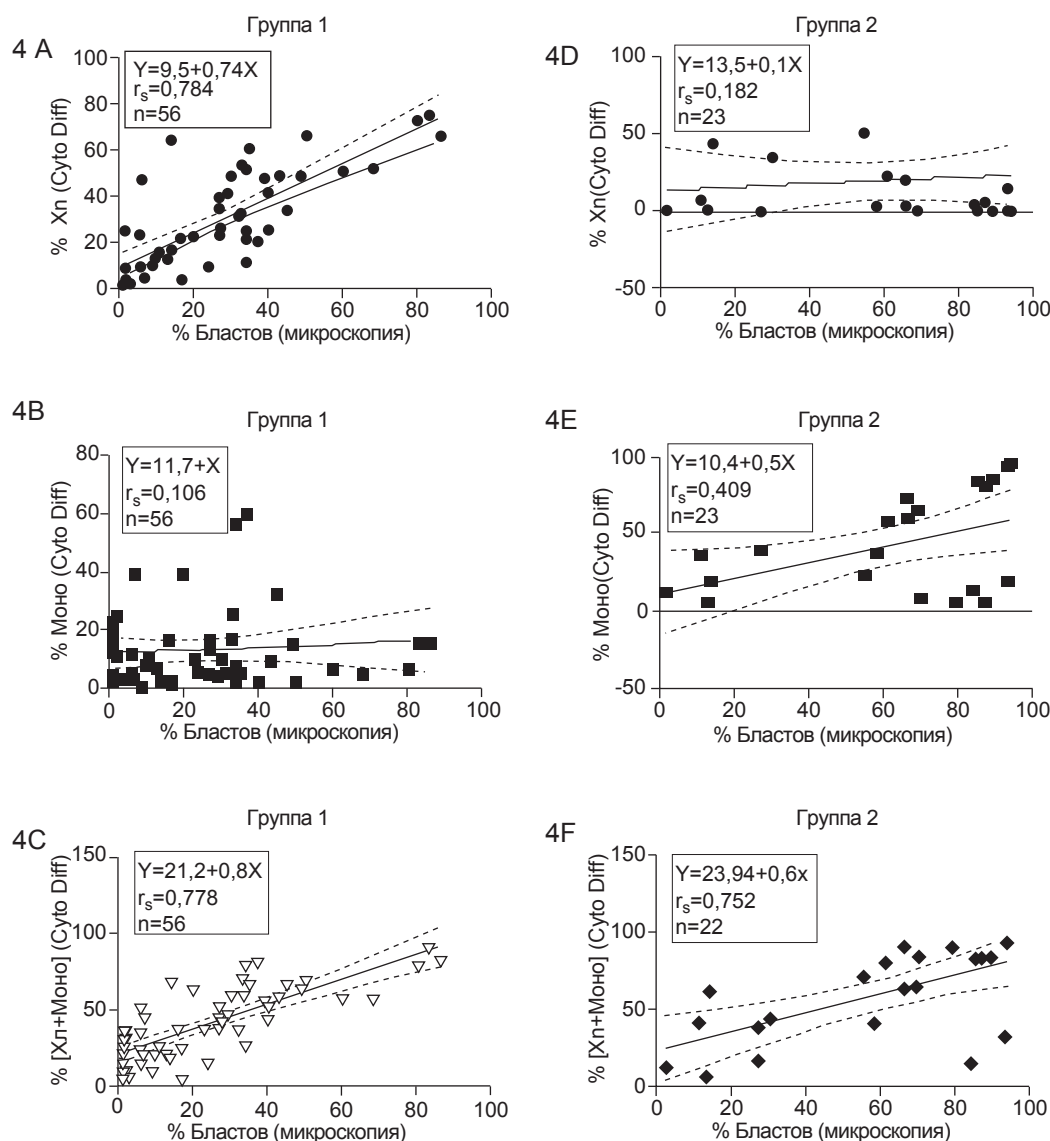


Рис. 3. Диаграммы корреляции процента бластных клеток с параметрами проточного цитометра Cytomics FC500 (% Xn, % Моно, % [Xn + Моно]) с использованием реагента CYTODIFF™ в двух группах больных ОМЛ и ОММЛ.

оценке делает вероятным наличие у пациента ОМЛ с количеством МПО-позитивных бластов от 30 до 65%. В случае обнаружения бластных клеток в мазке крови и отсутствия увеличения процента клеток в LUC-зоне следует обратить внимание на количество моноцитов и нейтрофилов в результатах анализа и наличие морфологического флага «незрелые гранулоциты» (IG). При их появлении у больного можно предположить ОМЛ с количеством МПО-позитивных бластных клеток более 65%. Одновременное увеличение количества LUC-клеток и лимфоцитов позволяет сделать предположение о наличии у пациента ОЛЛ. В случае визуализации в мазке крови микроформ бластов может быть увеличен только процент лимфоцитов, а процент LUC оставаться в пределах нормы.

При оценке результатов анализа лейкоцитарной формулы с использованием реагента CYTODIFF™ на проточном цитометре Cytomics FC500 («Beckman Coulter») при одновременной визуализации бластных клеток и увеличении количества Xn-бластов наиболее вероятно обнаружение ОМЛ. В случае увеличения количества как Xn-бластов, так и моноцитов или только моноцитов либо возрастания количества Xn-бластов

можно предположить наличие ОММЛ. Увеличение процента Xb-бластов в крови предполагает диагноз В-ОЛЛ. Однако одновременное увеличение Xb- и Xt- бластов позволяет предположить диагноз Т-ОЛЛ.

Для правильной интерпретации результатов необходимо знать принцип и особенности распределения лейкоцитов на скатерограмме в зависимости от применяемой в гемализаторах технологии. Проточная цитометрия с коктейлем моноклональных антител CYTODIFF™ с целью дифференциального подсчета лейкоцитов является скрининговым методом, который позволяет выявить с высокой чувствительностью наличие патологических популяций клеток, в том числе бластных, и предположить иммунологический вариант ОЛ. Обнаружение клеток в бластном регионе требует морфологического подтверждения и с целью определения варианта ОЛ – дальнейшего расширенного иммунофенотипирования с использованием широкой панели моноклональных антител.

Таким образом, современные технологии автоматизированного анализа крови позволяют проводить быстрый первичный скрининг патологических образцов крови, подозрительных на присутствие бластных клеток. Использование

данных методов может оказать существенную помощь в своевременной диагностике ОЛ.

Благодарность. Авторы выражают благодарность руководству компании «Beckman Coulter» за предоставленный набор реагентов CYTODIFF™.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 4, 6–9 см. REFERENCES)

1. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В., Грицаев С.В., Семочкин С.В., Бондаренко С.Н. и др., Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59(1): 5.
2. Луговская С.А., Почтарь М.Е. *Гематологический атлас*. Москва: Триада, 2016.
5. Инструкция к прибору ADVIA® 2120/2120i, Siemens.

REFERENCES

1. Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Aphanasiev B.V., Gricev S.V., Semochkin S.V., Bondarenko S.N. and oth., National clinical guideline of diagnostic and treatment acute myeloid leukemia's for adults. *Hematologiya i Transfuziologiya*. 2014; 59(1): 5. (in Russian)

2. Lugovskaya S.A., Pochtar M.E. *Atlas of Hematology [Gematologicheskiy atlas]*. Moscow: Triada; 2016. (in Russian)
3. Daniel A. Arber, Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau et al.. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127: 2391-2405 [Online]. Available: doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.
4. Kutter D. Prevalence of myeloperoxidase deficiency: population studies using Bayer-Technicon automated hematology. *J. Mol. Med.* 1998; 79: 669-75.
5. Operator's Guide ADVIA® 2120/2120i Hematology Systems, Siemens.
6. Depoorter M. Optimal flagging combinations for best performance of five blood cell analyzers. *Int. J. Lab. Hematol.* 2015; 37(1): 63-70 [Online]. Available: doi: 10.1111/ijlh.12238.
7. Rabizadeh E., Pickholtz I., Barak M., Isakov E., Zimra Y., Froom P. Acute leukemia detection rate by automated blood count parameters and peripheral smear review. *Int. J. Lab. Hematol.* 2015; 37(1):44-9.
8. Shelat S.G., Canfield W., Shibutani S. Differences in detecting blasts between ADVIA 2120 and Beckman-Coulter LH750 hematology analyzers. *Int. J. Lab. Hematol.* 2010; 32(1): 113-6.
9. Kahng J., Yonggoo Kim, Myungshin Kim, Eun-Jee Oh., Yeon-Joon Park, Kyungja Han. Flow Cytometric White Blood Cell Differential Using CytoDiff is Excellent for Counting Blasts. *Ann. Lab. Med.* 2015; 35(1): 28-34. [Online]. Available: doi: 10.3343/alm.2015.35.1.28.

Поступила 13.01.18

Принята к печати 25.01.18

КОАГУЛОЛОГИЯ

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.127-005.4-036.12+616.379.008.64]-06.616.132.2-007.271-039.5

Габбасов З.А.¹, Козлов С.Г.¹, Мельников И.С.^{1,2}, Бязрова С.В.¹, Сабурова О.С.¹, Прокофьева Л.В.¹

CD45-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ ТРОМБОЦИТЫ И ОТНОШЕНИЕ УРОВНЯ НЕЙТРОФИЛОВ К ЛИМФОЦИТАМ В ОЦЕНКЕ РИСКА РАЗВИТИЯ РЕСТЕНОЗА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, 121552, Москва;

²ГНЦ «Институт медико-биологических проблем» РАН, 123007, Москва

Цель работы – исследование значимости определения количества CD45-положительных тромбоцитов и отношения уровня нейтрофилов к лимфоцитам в оценке риска развития рестеноза после имплантации стентов с лекарственным покрытием (DES) у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца (ИБС) и сахарным диабетом 2-го типа (СД2).

Обследовано 126 больных с хроническими формами ИБС, которым в течение первого года после имплантации стентов с лекарственным покрытием была проведена повторная коронароангиография. В зависимости от наличия СД2 пациенты были разделены на две группы. У пациентов обеих групп проведено сравнение ангиографической и клинической характеристик, а также построена логистическая модель, прогнозирующая развитие рестеноза.

Рестеноз возникал чаще у пациентов с СД2 (54,5% случаев), чем у пациентов без СД2 (32,4% случаев; $p = 0,01$). Путём сравнения более 35 характеристик мы определили факторы риска возникновения рестеноза с наиболее высокой предсказательной способностью среди пациентов с СД2. Этими факторами риска являлись CD45-положительные тромбоциты и отношение нейтрофилов к лимфоцитам. Для предсказания развития рестеноза была построена логистическая регрессионная модель, в которую вошли количество циркулирующих CD45-положительных тромбоцитов, отношение нейтрофилов к лимфоцитам и наличие СД2. Модель продемонстрировала высокую предсказующую ценность в отношении возникновения рестеноза: ОШ = 15,1 (95%ДИ 4,81–31; $p < 0,001$). Площадь под ROC-кривой: AUC = 0.83 (95% ДИ 0,72–0,92; $p < 0,001$). Повышение количества циркулирующих CD45-положительных тромбоцитов и соотношение уровня нейтрофилов и лимфоцитов могут рассматриваться как значимые факторы риска развития рестеноза при СД2.

Для корреспонденции: Зуфар Ахнафович Габбасов, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. стволовых клеток человека Института экспериментальной кардиологии; e-mail: zufargabbasov@yandex.ru

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца; стенты с лекарственным покрытием; рестеноз; CD45-положительные тромбоциты; отношение нейтрофилов к лимфоцитам; сахарный диабет 2-го типа; воспаление.

Для цитирования: Габбасов З.А., Козлов С.Г., Мельников И.С., Бязрова С.В., Сабурова О.С., Прокофьева Л.В. CD45-положительные тромбоциты и отношение уровня нейтрофилов к лимфоцитам в оценке риска развития рестеноза у пациентов с хронической ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2-го типа. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (4): 233-238. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-233-238>

Gabbasov Z.A.¹, Kozlov S.G.¹, Melnikov I.S.^{1,2}, Byazrova S.V.¹, Saburova O.S.¹, Prokofieva L.V.¹

THE CD45-POSITIVE THROMBOCYTES AND NEUTROPHILS/LYMPHOCYTES LEVEL RATIO IN EVALUATION OF RISK OF DEVELOPMENT OF RE-STENOSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC ISCHEMIC HEART DISEASE AND DIABETES MELLITUS TYPE II

¹The Federal State Budget Institution "The National Medical Research Center of Cardiology" of Minzdrav of Russia, 123007, Moscow, Russia

²The State Scientific Center "The Institute of Medical Biological Problems" of the Russian Academy of Sciences, 123007, Moscow, Russia

The purpose of study is to investigate significance of detection of number of CD45-positive thrombocytes and ratio neutrophils/lymphocytes in evaluation of risk of development of re-stenosis after implantation of drug-eluting stents in patients with chronic ischemic heart disease and diabetes mellitus type II. The examination was applied to 126 patients with chronic forms of ischemic heart disease who passed through repeat coronary angiography during first year after implantation of drug-eluting stents. The patients were separated on two groups depending on availability of diabetes mellitus type II. In both groups, the patients passed through comparing of angiography and clinical characteristics. Also, a logistic model was developed prognosticating development of re-stenosis.

The re-stenosis developed more often in patients with diabetes mellitus type II (54.5%) than in patients without diabetes mellitus type II (32.4%; $p=0.01$). The comparative analysis of more than 35 characteristics permitted to establish risk factors of development of re-stenosis with the highest prognosticating capacity among patients with diabetes mellitus type II. These risk factors were CD45-positive thrombocytes and ratio neutrophils/lymphocytes. To prognosticate development of re-stenosis a logistic regression model was developed comprising number of circulating CD45-positive thrombocytes, ratio neutrophils/lymphocytes and availability of diabetes mellitus type II. The model demonstrated high prognosticating value as regards development of re-stenosis: $OR = 15.1$ (95% CI 4.81-31, $p < 0.001$). The square under ROC-curve: $AUC = 0.83$ (95% CI 0.72-0.92; $p < 0.001$). The increasing of number of circulating CD45-positive thrombocytes and ratio neutrophils/lymphocytes can be considered as a valuable risk factors of development of re-stenosis in case of diabetes mellitus type II.

Key words: ischemic heart disease; drug-eluting stent; re-stenosis; CD45-positive thrombocytes; ratio neutrophils/lymphocytes; diabetes mellitus type II; inflammation.

For citation: Gabbasov Z.A., Kozlov S.G., Melnikov I.S., Byazrova S.V., Saburova O.S., Prokofieva L.V. The CD45-positive thrombocytes and neutrophils/lymphocytes level ratio in evaluation of risk of development of re-stenosis in patients with chronic ischemic heart disease and diabetes mellitus type II. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(4): 233-238. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-233-238>

For correspondence: Gabbasov Z.A., doctor of biological sciences, leading researcher of the Laboratory of Stem Cells of the Federal State Budget Institution "The National Medical Research Center of Cardiology", e-mail: zufargabbasov@yandex.ru

Information about authors:

Gabbasov Z.A., <http://orcid.org/0000-0003-3878-2573>

Kozlov S.G., <http://orcid.org/0000-0001-8800-1670>

Melnikov I.S., <http://orcid.org/0000-0001-5241-3091>

Byazrova S.V., <http://orcid.org/0000-0003-0741-4372>

Saburova O.S., <http://orcid.org/0000-0002-5702-9037>

Prokofieva L.V., <http://orcid.org/0000-0002-0230-2489>

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

Acknowledgment. The study was supported by the Grant of the Russian Scientific Foundation (Project № 16-15-10098)

Received 13.12.2017
Accepted 17.12.2017

Введение. Сахарный диабет 2-го типа (СД2) связан с повышенным риском развития рестеноза [1]. Более длительный и выраженный характер течения воспалительного процесса в ответ на повреждение стенки артерии, свойственный пациентам с СД2, может усиливать рост неинтимы после коронарного стентирования и приводить к рестенозу [2]. Повышение концентрации провоспалительных медиаторов в крови связано с увеличением риска возникновения рестеноза у пациентов с СД2 [3]. Помимо хорошо изученных биомаркеров воспаления, таких как высокочувствительный С-реактивный белок (вЧСРБ), в настоящее время активно исследуются новые биомаркеры, способные предсказывать развитие рестеноза. М. Balli и соавт. [4] показали, что увеличение соотношения уровня нейтрофилов и лимфоцитов может выступать предиктором возникновения рестеноза

после установки непокрытых металлических стентов. В своей недавней работе мы выявили связь между возникновением рестеноза после имплантации стентов с лекарственным покрытием и увеличением количества циркулирующих в крови CD45-положительных тромбоцитов, а также отношения уровня нейтрофилов к уровню лимфоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) [5]. Мы предположили, что эти маркеры воспаления могут оказывать значимыми факторами риска при наличии СД2 у пациентов с ИБС. Целью настоящей работы явилось исследование значимости определения количества CD45-положительных тромбоцитов и отношения уровня нейтрофилов к уровню лимфоцитов в оценке риска развития рестеноза после имплантации стентов с лекарственным покрытием у пациентов с хронической ИБС и СД2.

Материал и методы. В исследование включены 126 пациентов мужского и женского пола в возрасте от 40 до 75 лет со стенокардией напряжения, которым проводилась коронароангиография в сроки от 6 до 12 мес после коронарной ангиопластики с имплантацией стентов с лекарственным покрытием. Набор пациентов происходил с 2012 по 2015 г. Рестенозом в ранее стентированном сегменте коронарной артерии считали сужение просвета на 50% и более внутри стента и на расстоянии < 5 мм дистальнее или проксимальнее его краев [6]. В исследование не включали пациентов старше 75 лет, а также пациентов с нестабильной стенокардией, перенесённым инфарктом миокарда в течение последних 2 мес, предшествующим коронарным шунтированием или баллонной ангиопластикой, фракцией выброса левого желудочка менее 40%, застойной сердечной недостаточностью, уровнем креатинина более 150 мкмоль/л, тяжёлыми сопутствующими заболеваниями. Проект был одобрен этическим комитетом. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании.

Длина имплантированных стентов составляла 18–33 мм, диаметр – 2,25–3,5 мм. Все пациенты получали аспирин в дозе 100 мг в сутки и клопидогрел в дозе 75 мг в сутки как минимум в течение 5 дней до коронарного стентирования. Всем пациентам во время стентирования болюсно вводился гепарин. Ингибиторы рецепторов гликопротеина IIb/IIIa применялись по назначению лечащего врача. За весь период наблюдения все пациенты получали аспирин и клопидогрел в неизменных дозах. Статины, антиангинальная и гипотензивная терапия назначались лечащим врачом.

Выявление CD45-положительных тромбоцитов. Для измерения экспрессии специфических антигенов тромбоцитов кровь пациентов отбирали из локтевой вены в пробирки с 3,8% цитрата натрия в соотношении антикоагулянт/кровь 1:9. Обогащённую тромбоцитами плазму отделяли центрифугированием при 150 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант отбирали и хранили при комнатной температуре не более 4 ч. Обогащённую тромбоцитами плазму получали центрифугированием крови при 2000 g в течение 15 мин.

В 100 мкл обогащённой тромбоцитами плазмы добавляли 100 мкл PBS-EDTA (0,1 M фосфатный буфер с 2 мМ ЭДТА, pH 7,4). Затем образец фиксировали, добавляя в него 200 мкл 2% параформальдегида в фосфатном буфере. Материал хранили при 4°C до 4 сут максимально. Перед проведением измерения в микропробирку с 5 мкл обогащённой тромбоцитами плазмы добавляли 5 мкл CD42-PE и 5 мкл CD45-Cy5PE. Клеточные суспензии тщательно перемешивали и инкубировали в темноте в течение 40 мин. По окончании реакции в пробы

добавляли 500 мкл фосфатного буфера (PBS, 0,1 M, pH 7,4) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson). Сбор и обработку информации производили с помощью программы CELLQuest (Becton Dickinson). В каждом образце накапливали от 50 000 до 100 000 событий в гейте CD42-положительных клеток (тромбоцитов).

Количество тромбоцитов CD45+ определяли с использованием комбинации двух антител: (i) конъюгированных с фикоэритрином антител к CD42 (CD42-PE) и (ii) конъюгированных с комплексом фикоэритрин–цианин-5 антител к CD45 (CD45-Cy5PE). Мышинные изотипичные иммуноглобулины, конъюгированные с соответствующими флуорофорами, использовали в качестве контрольных антител.

Образцы крови и лабораторные анализы. Для лабораторных исследований кровь отбирали из локтевой вены в пробирки с ЭДТА. Подсчёт форменных элементов крови выполнялся в цельной крови и включал общее число лейкоцитов, нейтрофилов, моноцитов, базофилов, эозинофилов, лимфоцитов, тромбоцитов. Для последующих лабораторных исследований кровь центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин, супернатант хранили при -38°C. Уровень общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности, липопротеидов высокой плотности, триглицеридов, глюкозы, креатинина, вЧСРБ был измерен в плазме крови и использован в логистическом регрессионном анализе.

Статистический анализ. Значения нормального распределения были выражены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($M \pm SD$), а значения с асимметричным распределением были выражены через медиану (верхний квартиль, нижний квартиль). Для проверки гипотез, связанных с видом распределения, был применён критерий Шапиро–Уилка. Сравнение пациентов проводилось непараметрическим точным критерием Фишера или U-критерием Манна–Уитни для сравнения двух групп и критерием Краскала–Уоллиса ANOVA для сравнения трёх групп пациентов и более. Для проведения многофакторного логистического регрессионного анализа и выявления независимых факторов риска возникновения рестеноза использовали существенные переменные, полученные с помощью однофакторного логистического регрессионного анализа. Для оценки качества предсказывающей ценности проведённого логистического анализа в прогнозировании развития рестеноза использовали показатель AUC (площадь под ROC-кривой). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ выполнялся с помощью программного пакета SPSS Statistics версии 23.0 (SPSS Inc., USA).

Таблица 1

Клиническая характеристика

Параметр	Пациенты с СД2 (n = 55)	Пациенты без диабета (n=71)	p
Возраст, годы	62,4 $\pm$ 9,5	62,2 $\pm$ 11,3	0,92
Мужчины/женщины	41 (75) / 14 (25)	54 (76) / 17 (24)	0,90
Инфаркт миокарда в анамнезе	29 (52,7)	49 (69)	0,07
Артериальная гипертензия	54 (98,2)	65 (91,2)	0,11
Гиперлипидемия	55 (100)	70 (98,6)	0,81
Курение	28 (50,9)	34 (47,9)	0,74
Рестеноз	30 (54,5)	23 (32,4)	0,01
Одна магистральная коронарная артерия	32 (58,2)	48 (67,6)	0,36
Две магистральных коронарных артерий	14 (25,5)	18 (25,4)	0,99
Три магистральных коронарных артерий	32 (16,4)	5 (7,0)	0,10

Примечание. Здесь и в табл. 2 указано количество пациентов, в скобках – % от общего количества. Возраст представлен как $MEAN \pm SD$.

Таблица 2

Ангиографическая характеристика

Параметр	Пациенты с СД2 (n=5)	Пациенты без диабета (n=71)	p
Число стентов у одного пациента	2,2±1,4	1,9±1,1	0,18
Передняя нисходящая артерия	33 (60,0)	43 (60,6)	0,91
Огибающая артерия	20 (36,4)	29 (40,8)	0,65
Правая коронарная артерия	32 (58,2)	31 (43,7)	0,12
Бифуркационный стеноз	0	2 (2,8%)	0,21
Окклюзия	16 (29,1)	23 (32,4)	0,72
Протяжённый стеноз >20 мм	31(56,4)	42 (59,2)	0,74
Диаметр артерии <2,75 мм	27 (49,1)	23 (32,4)	0,09

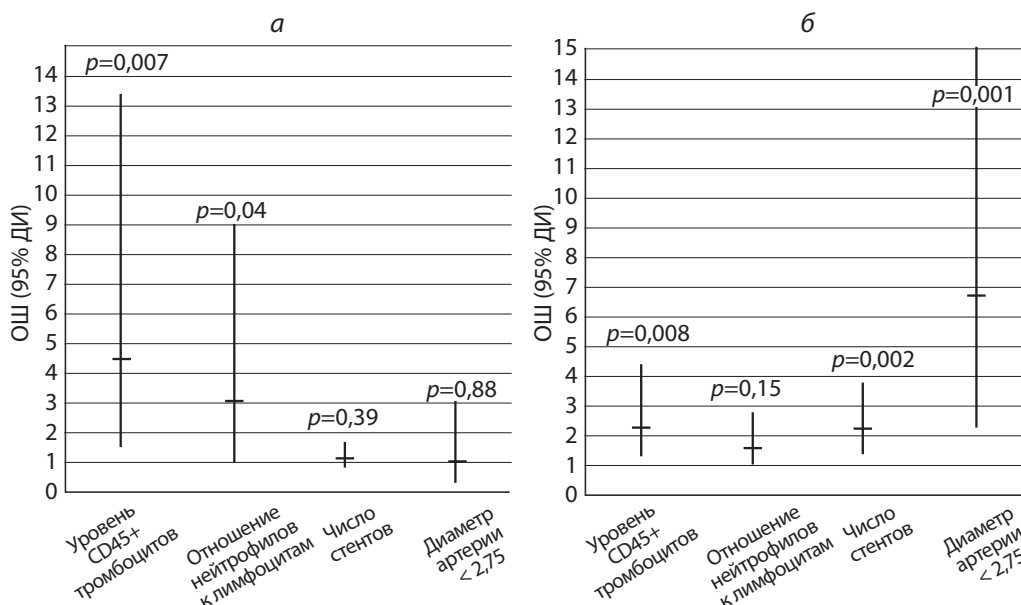
Результаты. Клинические и ангиографические характеристики пациентов. В исследование включено 126 пациентов с хронической ИБС, которым было имплантировано 227 стентов. Из них 81 стент был покрыт сиролимусом, 59 – зотаролимусом, 54 – эверолимусом и 3 стента – паклитакселом. В зависимости от наличия СД2 пациенты были разделены на две группы. В 1-ю включено 55 пациентов с СД2, во 2-ю – 71 пациент без диабета. Рестеноз возникал чаще у пациентов с СД2: у 30 (54,5%) с диабетом и у 23 (32,4%) без диабета ($p = 0,01$). Клиническая характеристика пациентов обеих групп на момент стентирования представлена в табл. 1.

Пациенты обеих групп достоверно не различались по возрасту, соотношению мужчин и женщин, курящих и некурящих, наличию дислипидемии. Количество пациентов со стенокардией напряжения I–IV функциональных классов не различалось в обеих группах. Равное число пациентов перенесли инфаркт миокарда и страдали артериальной гипертензией. Ангиографическая характеристика пациентов на момент стентирования представлена в табл. 2.

Среднее число имплантированных стентов у пациентов с

СД2 составило 2,2±1,4 и значимо не отличалось от такового у пациентов без диабета, у которых среднее число имплантированных стентов составило 1,9±1,1 у одного пациента. Пациенты обеих групп одинаково часто подвергались стентированию передней нисходящей артерии, огибающей и правой коронарной артерий, равно как стентированию окклюзий, протяжённых (> 20 мм) стенозов и артерий малого диаметра ($\leq 2,75$ мм).

Факторы риска развития рестеноза. Логистический регрессионный анализ более 35 клинических, лабораторных и ангиографических показателей позволил определить ряд значимых факторов риска возникновения рестеноза у пациентов с хронической ИБС. Рестеноз возникал чаще у пациентов с диабетом (54,5% случаев), чем у пациентов без диабета (32,4% случаев; $p = 0,01$). Наличие сахарного диабета являлось независимым значимым фактором риска возникновения рестеноза ОШ = 2,50 (95% ДИ 1,21–5,18; $p = 0,013$). Результаты однофакторного анализа факторов риска развития рестеноза при наличии или отсутствии у пациентов СД2 представлены на рисунке. У пациентов с СД2 наиболее значимыми факторами риска являлись уровень циркулирующих CD45-положительных тромбоцитов



Факторы риска развития рестеноза у пациентов с хронической ИБС, определённые путем бинарного логистического регрессионного анализа.

а – пациенты с СД2; б – пациенты без сахарного диабета. ОШ (95%ДИ) – отношение шансов развития у пациентов рестеноза (95% доверительный интервал).

с ОШ = 4,50 (95% ДИ 1,50–13,50; $p = 0,007$) и отношение уровня нейтрофилов к уровню лимфоцитов с ОШ = 3,09 (95% ДИ 1,05–9,10; $p = 0,04$). Среди пациентов с СД2 ангиографические факторы риска возникновения рестеноза оказались статистически незначимыми (рисунок, а). К этим факторам относятся стентирование артерий малого диаметра ($< 2,75$ мм) с ОШ = 1,08 (95% ДИ 0,38–3,13; $p = 0,88$) и число одновременно имплантированных стентов у одного пациента с ОШ = 1,19 (95% ДИ 0,80–1,79; $p = 0,39$). Картина существенно изменилась в группе пациентов без СД2 (рисунок, б). У этой группы пациентов ангиографические характеристики, а именно стентирование артерий малого диаметра и число одновременно имплантированных стентов оказались значимыми факторами риска рестеноза с ОШ = 6,7 (95% ДИ 2,2–30,4; $p = 0,001$) и ОШ = 2,99 (95% ДИ 1,43–6,27; $p = 0,002$), соответственно. Одновременно в сравнении с пациентами с СД2 в группе без диабета значительно снизилась значимость воспалительных показателей, таких как уровень циркулирующих CD45-положительных тромбоцитов (ОШ = 2,31, 95% ДИ 1,70–5,00; $p = 0,007$) и отношение уровня нейтрофилов к уровню лимфоцитов (ОШ = 1,55, 95% ДИ 0,86–2,81; $p = 0,15$). Различия в уровне вЧСРБ в крови пациентов с рестенозом и без рестеноза были статистически незначимыми в обеих группах. Количество нейтрофилов и лимфоцитов, взятых по отдельности, не влияло на риск развития рестеноза. Мы скомбинировали эти факторы как отношение уровня нейтрофилов к уровню лимфоцитов, что позволило получить новый статистически значимый параметр риска развития рестеноза.

Логистическая модель и независимые предикторы рестеноза. Путём выбора лучшей комбинации независимых переменных с наивысшим предсказательным потенциалом, в логистическую модель было включено 3 параметра: количество циркулирующих CD45-положительных тромбоцитов, отношение нейтрофилов к лимфоцитам и наличие СД2. В логит-модель не были включены такие параметры, как стентирование артерий малого диаметра, число одновременно имплантированных стентов, концентрация вЧСРБ, поскольку они не имели значимого влияния на прогностическую ценность логистической модели в целом. Логит-модель показала следующие предсказательные параметры возникновения рестеноза у больных ИБС и СД2: ОШ = 15,1 (95% ДИ 4,81–31; $p < 0,001$). Площадь под ROC-кривой: AUC = 0,83 (95% ДИ 0,72–0,92; $p < 0,001$).

Обсуждение. Мы обнаружили, что у пациентов с СД2 повышен уровень циркулирующих в крови CD45-положительных тромбоцитов. Антиген CD45 имеет лейкоцитарное происхождение. Появление его на тромбоцитах свидетельствует о взаимодействии между лейкоцитами и тромбоцитами. Вероятно, тромбоциты с CD45-лейкоцитарным антигеном появляются в циркулирующей крови в результате захвата лейкоцитарных микрочастиц. Известно, что лейкоциты способны образовывать микрочастицы, в том числе при воспалении [7]. Лейкоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия, опосредованные микрочастицами, хорошо известны [8]. Ранее мы уже выявляли наличие CD45-положительных тромбоцитов в крови пациентов с инфарктом миокарда [9]. В своей недавней работе мы также показали, что для пациентов с развившимся после имплантации стентов с лекарственным покрытием рестенозом характерно увеличение количества циркулирующих CD45-положительных тромбоцитов [5]. В настоящей работе мы продемонстрировали, что у пациентов с СД2 значимость этого показателя в прогнозе развития рестеноза существенно выше, чем у пациентов без диабета (ОШ 4,50 против 2,55 соответственно). Тем не менее остаётся неясным, является ли приобретение тромбоцитами лейкоцитарного антигена результатом локальной воспалительной активации клеток в месте имплантации стента

или оно отражает склонность пациентов к системному воспалительному ответу. Полная регенерация эндотелия при использовании стентов с лекарственным покрытием укладывается в рамки нескольких месяцев. Наше исследование проводилось спустя 6–12 мес после стентирования, это может говорить о том, что причиной увеличенной концентрации циркулирующих CD45-положительных тромбоцитов в крови является склонность к интенсивному и длительному воспалительному ответу, а не активация клеток крови в месте сосудистого повреждения.

Также нами было обнаружено, что увеличение соотношения уровня нейтрофилов и лимфоцитов может служить независимым предиктором возникновения рестеноза у пациентов с СД2. Повышение этого показателя свидетельствует о наличии активного системного воспалительного процесса. В последние годы соотношение уровня нейтрофилов и лимфоцитов стало рассматриваться как независимый фактор риска заболеваемости и смертности от неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [10, 11]. Однако как предиктор развития рестеноза оно практически не изучено [4, 12, 13]. В одном исследовании у пациентов с рестенозом в непокрытых стентах в бифуркационных стенозах выявляли повышение соотношения уровня нейтрофилов и лимфоцитов [4]. Ранее нами было опубликовано сообщение о повышении соотношения уровня нейтрофилов и лимфоцитов у пациентов с рестенозом после имплантации стентов с лекарственным покрытием [5]. В настоящей работе мы продемонстрировали, что у пациентов с СД2 после имплантации стентов с лекарственным покрытием повышение отношения уровня нейтрофилов к уровню лимфоцитов значимо даже в большей мере, чем в общей популяции пациентов с ИБС (ОШ = 3,09 против ОШ = 2,68 в общей популяции).

Уровень вЧСРБ не имел статистической значимости в предсказании развития рестеноза как у больных диабетом, так и в общей популяции. Результаты исследований способности вЧСРБ предсказывать нежелательные сердечно-сосудистые события часто противоречивы [14]. Одно из возможных объяснений неоднозначных результатов в исследованиях вЧСРБ может заключаться в том, что СРБ имеет две изоформы [15]. Он синтезируется в печени в форме пентамера, которая, возможно, не имеет провоспалительной активности. В месте локального воспаления происходит диссоциация пентамерной, или нативной, структуры С-реактивного белка (нСРБ) на пять мономерных фрагментов (мСРБ). Эта диссоциация, вероятно, лежит в основе обретения СРБ провоспалительных свойств [16]. Мономерная, или модифицированная, форма СРБ впервые была описана Л.Потемпа [17]. Показано, что мСРБ, но не нСРБ, активировал эндотелий *in vitro* [16]. Также мСРБ выявлен *in vivo* на циркулирующих микрочастицах пациентов в остром периоде инфаркта миокарда [18]. Кроме того, отложения мСРБ обнаружены в аутопсийном материале каротидных и аортальных атеросклеротических бляшек. При этом нСРБ в образцах бляшек отсутствовал [19]. Эти данные могут объяснять причину расхождений в результатах измерения вЧСРБ у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Представленная нами модель логистической регрессии предназначена для прогнозирования развития рестеноза после имплантации стентов с лекарственным покрытием у пациентов с хронической ИБС и наличием у них СД2. Два воспалительных биомаркера, количество CD45-положительных тромбоцитов и отношение уровня нейтрофилов к уровню лимфоцитов обладали статистически значимой способностью предсказывать развитие рестеноза. Интересно, что в присутствии сахарного диабета ангиографические характеристики, количество имплантированных стентов и диаметр стентированных артерий теряли свою прогностическую значимость. В предыдущей работе [5] мы писали, что в об-

щей выборке прогностической значимостью обладают как воспалительные, так и ангиографические параметры. Таким образом, усиление значимости воспалительных параметров при диабете и потеря значимости ангиографических характеристик поддерживает предположение о повышенной активности воспалительного процесса при наличии у пациентов сахарного диабета.

Выводы. Высокий уровень отношения шансов в прогнозе развития рестеноза при использовании провоспалительных биомаркеров в логит-модели позволяет рассматривать количество циркулирующих CD45-положительных тромбоцитов и отношение уровня нейтрофилов к уровню лимфоцитов как значимые факторы риска развития рестеноза при СД2.

Ограничения. Это ретроспективное исследование. После имплантации стентов коронароангиография выполнялась не всем пациентам, а только пациентам, которые были госпитализированы с возобновлением клиники стенокардии напряжения. Существует множество факторов, влияющих на развитие рестеноза после стентирования коронарных артерий, поэтому не исключено, что существуют иные параметры, не рассмотренные в этом исследовании, имеющие сопоставимое по силе влияние на развитие рестеноза. Мы не знаем фоновой концентрации CD45-положительных тромбоцитов у пациентов, принявших участие в исследовании, равно как и того, имели ли пациенты с рестенозом изменения в концентрации CD45-положительных тромбоцитов изначально или это является следствием имплантации стентов.

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 16-15-10098).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Van Belle E., Ketelers R., Bauters C., Périé M., Abolmaali K., Richard F. et al. Patency of percutaneous transluminal coronary angioplasty sites at 6-month angiographic follow-up: A key determinant of survival in diabetics after coronary balloon angioplasty. *Circulation*. 2001 Mar 6;103(9):1218-24.
2. Paiva M.S., Serrano C.V. Jr., Nicolau J.C., Jalut B.O., Fernandes J.L., De Lemos J.A. et al. Differences in the inflammatory response between patients with and those without diabetes mellitus after coronary stenting. *J. Interv. Cardiol.* 2008 Oct;21(5):403-9.
3. Wasser K., Schnaudigel S., Wohlfahrt J., Psychogios M.N., Knauth M., Gröschel K. Inflammation and in-stent restenosis: the role of serum markers and stent characteristics in carotid artery stenting. *PLoS One*. 2011;6(7):e22683.
4. Balli M., Taşolar H., Çetin M., Tekin K., Çağlayan Ç.E., Türkmen S. et al. Use of the neutrophil to lymphocyte ratio for prediction of in-stent restenosis in bifurcation lesions. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2015 May;19(10):1866-73.
5. Gabbasov Z., Kozlov S., Byazrova S., Saburova O., Melnikov I., Caprnda M. et al. Blood level of CD45+ platelets and development of restenosis after drug-eluting stent implantation in patients with stable coronary artery disease. *Wien Klin. Wochenschr.* 2016;Sep 8.
6. Mehran R., Dangas G., Abizaid A.S., Mintz G.S., Lansky A.J., Satler L.F. et al. Angiographic patterns of in-stent restenosis: classification and implications for long-term outcome. *Circulation*. 1999;100:1872-8.
7. Angelillo-Scherrer A. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. *Circ Res*. 2012;110:356-63.
8. Totani L., Evangelista V. Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Dec;30(12):2357-61.
9. Gabbasov Z., Ivanova O., Kogan-Yasny V., Ryzhkova E., Saburova O., Vorobyeva I. et al. Activated platelet chemiluminescence and presence of CD45+ platelets in patients with acute myocardial infarction. *Platelets*. 2014;25:405-8.
10. Papa A., Emdin M., Passino C., Michelassi C., Battaglia D., Cacci F. Predictive value of elevated neutrophil-lymphocyte ratio on cardiac mortality in patients with stable coronary artery disease. *Clin. Chim. Acta*. 2008;395:27-31.
11. Uthamalingam S., Patvardhan E.A., Subramanian S., Ahmed W., Martin W., Daley M. Utility of the neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term outcomes in acute decompensated heart failure. *Am. J. Cardiol.* 2011 Feb 1;107(3):433-8.
12. Duffy BK, Gurm HS, Rajagopal V, Gupta R, Ellis SG, Bhatt DL. Usefulness of an elevated neutrophil to lymphocyte ratio in predicting long-term mortality after percutaneous coronary intervention. *Am. J. Cardiol.* 2006 Apr 1;97(7):993-6.
13. Turak O, Ozcan F, Isleyen A, Tok D, Sokmen E, Buyukkaya E. Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio to predict bare-metal stent restenosis. *Am J Cardiol.* 2012;110:1405-10.
14. Niccoli G., Montone R.A., Ferrante G., Crea F. The evolving role of inflammatory biomarkers in risk assessment after stent implantation. *J. Am. Coll Cardiol.* 2010;56(22):1783-93.
15. Khreis T., Jozsef L., Potempa L.A., Filep J.G. Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation*. 2004;109:2016-22.
16. Thiele J.R., Habersberger J., Braig D., Schmidt Y., Goerendt K., Maurer V. The dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein localises and aggravates inflammation: in vivo proof of a powerful pro-inflammatory mechanism and a new anti-inflammatory strategy. *Circulation*. 2014;130(1):35-50.
17. Potempa L.A., Maldonado B.A., Laurent P., Zemel E.S., Gewurz H. Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium. *Mol. Immunol.* 1983;20:1165-75.
18. Habersberger J., Strang F., Scheichl A., Htun N., Bassler N., Merivirta R.M. Circulating microparticles generate and transport monomeric C-reactive protein in patients with myocardial infarction. *Cardiovascular Research*. 2012;96(1): 64-72.
19. Eisenhardt S.U., Habersberger J., Murphy A., Chen Y.C., Woollard K.J., Bassler N. et al. Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein on activated platelets localizes inflammation to atherosclerotic plaques. *Circ. Res.* 2009 Jul 17;105(2):128-37.

Поступила 05.12.17

Принята к печати 13.12.17

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 618.145-002.2-078.33:001.891.57

Агарков Н.М.¹, Головченко О.В.², Охотников О.И.³, Будник И.В.¹, Аксёнов В.В.¹, Иванов В.А.³

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ ОСТРОГО ЭНДОМЕТРИТА НА ОСНОВЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ И КЛАСТЕРНОГО АНАЛИЗА ПАРАМЕТРОВ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА

¹ ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет» 305040, Курск, Россия;

² Перинатальный центр ОГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа» 308007, Белгород, Россия;

³ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», 305041, Курск, Россия

Одним из распространенных осложнений послеродового периода и абортс считается острый эндометрит, вызывающий выраженные нарушения местного иммунитета. Цель данного исследования – совершенствование диагностики острого эндометрита на основе выделенных и методом корреляционного моделирования и кластерного анализа приоритетных в диагностическом аспекте иммунологических показателей вагинально-цервикальной слизи. Сформированы основная (154 больных острым эндометритом) и контрольная группы (103 пациента с неосложненным послеродовым периодом), у которых методом иммуноферментного анализа изучены содержание иммуноглобулинов, компонентов комплемента и лизоцима в вагинально-цервикальной слизи. Отбор диагностически значимых показателей проведен с помощью корреляционного и кластерного методов. Выявлено, что ведущими диагностическими показателями местного иммунитета для острого эндометрита являются Ig M, sIg A, C₄ компонента комплемента и лизоцим. Установленные диагностически значимые параметры местного иммунитета обеспечивают совершенствование выявления острого эндометрита по наименьшему числу показателей.

Ключевые слова: острый эндометрит, местный иммунитет, корреляционный анализ, кластерный метод, иммуноферментный анализ.

Для цитирования: Агарков Н.М., Головченко О.В., Охотников О.И., Будник И.В., Аксёнов В.В., Иванов В.А. Совершенствование диагностики острого эндометрита на основе моделирования и кластерного анализа параметров местного иммунитета. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (4): 239-242. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-239-242>

Agarkov N.M.1, Golovchenko O.V.2, Okhotnikov O.I.3, Budnik I.V.1, Aksenov V.V.1, Ivanov V.A.3

THE DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC OF ACUTE ENDOMETRITIS ON THE BASIS OF MODELING AND CLUSTER ANALYSIS OF PARAMETERS OF LOCAL IMMUNITY

¹The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The South-Western State University", 305040, Kursk, Russia

²The Oblast State Budget Health Care Institution "The Prelate Josaphat Belgorod Oblast Clinical Hospital", 308007, Belgorod, Russia

³The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kursk State Medical University", 305041, Kursk, Russia

The acute endometritis provoking expressed disorders of local immunity is considered as one of the prevalent complications of post-natal period and abortions. The purpose of study is to develop diagnostic of acute endometritis on the basis of applied correlation modeling and cluster analysis techniques diagnostically priority-driven immunological indices of vaginal cervical mucus. The sample included main group (154 patients with acute endometritis) and control group (103 patients with uncomplicated post-natal period). Both groups were subjected to enzyme-linked immunosorbent assay to analyze content of immunoglobulins, components of complement and lysozyme in vaginal cervical mucus. The sampling of diagnostically significant indices was implemented using correlation and cluster analysis techniques. It is established that chief diagnostic indices of local immunity in case of acute endometritis are Ig M, sIg A, C₄ components of complement and lysozyme. The established diagnostically significant parameters of local immunity provide development of detection of acute endometritis according less number of indices.

Key words: acute endometritis; local immunity; correlation analysis; cluster analysis; enzyme-linked immunosorbent assay.

For citation: Agarkov N.M., Golovchenko O.V., Okhotnikov O.I., Budnik I.V., Aksenov V.V., Ivanov V.A. The development of diagnostic of acute endometritis on the basis of modeling and cluster analysis of parameters of local immunity. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(4): 239-242. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-239-242>

For correspondence: Agarkov N.M., doctor of medical sciences, professor of the chair of Biomedical Engineering of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The South-Western State University", e-mail: vitalaxen@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 02.11.2017
Accepted 25.01.2018

Для корреспонденции: Агарков Николай Михайлович, д-р мед. наук, проф. каф. биомедицинской инженерии Юго-Западного государственного университета; e-mail: vitalaxen@mail.ru

Введение. Среди воспалительных заболеваний женских половых органов острый эндометрит (ОЭ) на протяжении многих лет остается одной из наиболее актуальных проблем в клинической практике в связи с его высокой частотой [1]. ОЭ в структуре воспалительных заболеваний органов малого таза составляет от 6% до 27% [2]. В современных условиях высокой остается частота ОЭ после родов, аборт и особенно после кесарева сечения, несмотря на проводимые в этом направлении многочисленные исследования [3–5].

ОЭ вызывает выраженные иммунные нарушения, в том числе на местном уровне, которые необходимо учитывать при его диагностике. При этом рациональнее осуществлять диагностику ОЭ по наиболее значимым иммунологическим параметрам вагинальноцервикальной слизи, исключив из анализа второстепенные и несущественные представители иммунограммы. Вместе с тем на сегодняшний момент в научных публикациях отсутствует информация о ведущих диагностически значимых показателях местного иммунитета для выявления ОЭ, отобранных посредством объективных методов количественного анализа.

Цель данного исследования – совершенствование диагностики ОЭ на основе выделенных методом корреляционного моделирования и кластерного анализа приоритетных в диагностическом аспекте иммунологических показателей вагинальноцервикальной слизи.

Материал и методы. Сформировано две клинические группы – основная и контрольная. Основная группа представлена 154 больными с послеродовым ОЭ, а контрольная группа – 103 пациентками с неосложненным послеродовым периодом. Изученные группы не имели существенных клиникодемографических различий.

Определение в вагинальном секрете иммуноглобулинов проводили методом иммуноферментного анализа с помощью тестсистем с моноклональными антителами к иммуноглобулинам человека («Полигност», Санкт-Петербург). Содержание компонентов комплемента, лизоцима в вагинальноцервикальном секрете изучали с использованием наборов реагентов ProCon (ООО «Протеиновый контур», Санкт-Петербург).

Статистическая обработка данных выполнялась на ЭВМ с применением программы «Statistica 6.0». Для выделения ведущих показателей местного иммунитета у больных ОЭ использовался корреляционный и кластерный метод. Оценка достоверности проводилась по критерию ТУайта и *t* Стьюдента. Значимым считалось различие при $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. В вагинальноцервикальной слизи показатели локального гуморального иммунитета при ОЭ характеризуются репрезентативным повышением уровня Ig M, Ig G и снижением sIg A (см.таблицу). Увеличение содержания Ig A в основной группе является незначительным и статистически незначимым ($P > 0,05$). Компоненты комплемента значительно повышены у больных ОЭ. Особенно это относится к компонентам комплемента C_4 и C_1 , содержание которых возросло наиболее существенно ($p < 0,001$). Достоверными оказались и изменения других компонентов – C_2 , C_3 и C_5 . При этом менее значительное изменение, а именно снижение компоненты комплемента отмечено для C_5 ($p < 0,05$). У больных ОЭ достоверно снизилось содержание лизоцима в вагинальноцервикальной слизи.

При анализе иммунологических показателей в цервикальной слизи и эндометриальном секрете обнаружено, что общее количество нейтрофилов, а также жизнеспособных лейкоцитов, лизосомальная активность, спонтанная НСТ-реакция нейтрофилов выше в группе больных ОЭ [6, 7]. У женщин с послеродовым ОЭ обнаружены отклонения показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови от таковых у здоровых родильниц. Так, у больных ОЭ повышалось количество НСТ-

Показатели иммунитета на местном уровне у пациенток с ОЭ ($M \pm m$)

Показатель локального иммунитета, единица измерения	Больные ОЭ	Контроль
Ig M, г/л	0,27±0,1*	0,05±0,02*
Ig A, г/л	0,13±0,02	0,09±0,02
Ig G, г/л	0,92±0,08*	0,41±0,05*
sIg A, г/л	0,14±0,03*	0,45±0,06*
C_1	66,5±2,6*	38,3±1,7*
C_2	68,2±1,5*	46,7±1,4*
C_3	64,7±2,0*	43,6±1,5*
C_4	74,5±2,3*	38,1±0,9*
C_5	31,4±1,5*	38,9±1,7*
Лизоцим, г/л	0,6±0,02	2,1±0,04

Примечание. * Репрезентативное различие.

положительных форм лейкоцитов. Одновременно с этим статистически значимо увеличился индекс активации нейтрофилов. Выявленные сдвиги свидетельствуют о повышении кислородзависимых процессов в клетках, которые приводят к высвобождению большого количества свободных радикалов кислорода. На этом фоне в нейтрофилах усиливаются функции, не зависящие от кислородных процессов [8].

На основе метода нейросетевого моделирования установлено, что достоверными и наиболее значимыми для диагностики и прогнозирования ОЭ после медицинского аборта среди иммунологических показателей являются: снижение абсолютного содержания CD72+ клеток менее $0,25 \times 10^9/\text{л}$, повышение относительного содержания CD4+ клеток более 34,9% [9]. Диагностическое и прогностическое значение имеют также степень чистоты влагалищного содержимого, срок выполнения аборта.

Использование в качестве диагностических критериев ОЭ количества и направления корреляционных достоверных связей позволяет улучшить и рационализировать его выявление (рис. 1, а, б). Сопряженность параметров местного гуморального иммунитета в основной группе значительно выше, чем в контроле. Больше всего корреляционных связей отмечено для Ig M, которые имеют прямые соотношения с содержанием в вагинальноцервикальной слизи компонентов комплемента C_1 и C_4 , с Ig G. Обратная связь Ig M установлена с sIg A. Компонента комплемента C_4 активно вовлечена во внутрисистемные взаимоотношения и представлена тремя достоверными корреляциями. Прямые связи компонента комплемента C_4 установлены с Ig M и компонентой комплемента C_1 , а обратное соотношение – с лизоцимом. Лизоцим

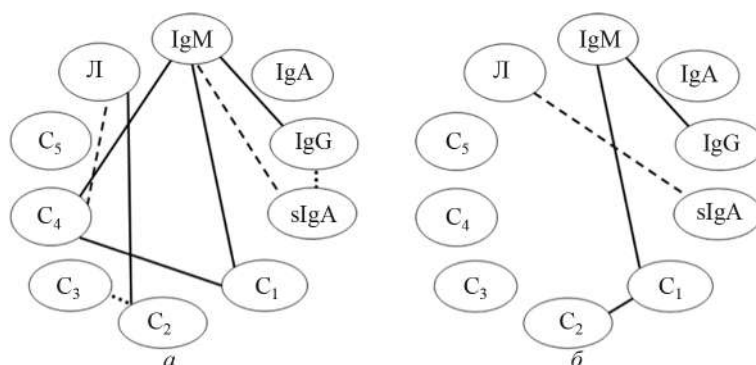


Рис. 1. Модели взаимосвязей местного иммунитета у пациенток с ОЭ (а) и в контроле (б).

Сплошная линия – прямая достоверная связь; пунктирная – обратная достоверная связь; с точками – криволинейная достоверная связь.

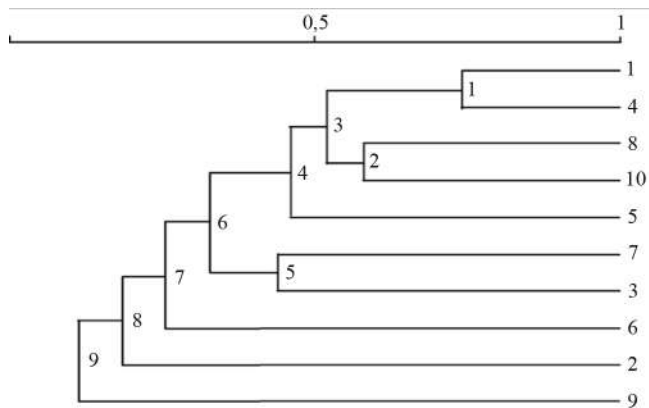


Рис. 2. Кластеризация параметров местного иммунитета у пациенток с ОЭ.

1 – иммуноглобулины М, 2 – иммуноглобулины А, 3 – иммуноглобулины G, 4 – секреторный иммуноглобулин А, 5 – компонента комплемента C_1 , 6 – компонента комплемента C_2 , 7 – компонента комплемента C_3 , 8 – компонента комплемента C_4 , 9 – компонента комплемента C_5 , 10 – лизоцим.

соответственно имеет две корреляционные связи. Достоверные криволинейные зависимости выявлены между Ig G и sIg A, компонентами комплемента C_2 и C_3 .

Корреляционная модель в контрольной группе существенно отличается как по числу, так и по направлению связей. Выявлено две прямые достоверные связи между содержанием в вагинальноцервикальной слизи Ig M и Ig G, компонентами комплемента C_1 и C_2 . Обратное соотношение отмечено для лизоцима и sIg A, а также – для компонентов комплемента C_4 и C_5 .

Содержание иммуноглобулинов А, М и G в цервикальной слизи при ОЭ после родов значительно выше, чем у здоровых женщин [10]. У пациенток с послеродовым эндометритом наблюдается снижение местной иммунореактивности за счет уменьшения экспрессии TLR4 (лигандлиполисахариды грамотрицательных бактерий) и TLR5 (лигандфлагеллин бактерий) [11]. С уровнем TLR4 коррелировал уровень экспрессии супероксиддисмутазы ($r=0,63$; $p<0,01$), а с TLR5 $r=0,74$. С уровнем TLR1, TLR2 и экспрессией каталазы корреляционная связь равна 0,43 и 0,55 соответственно.

При сокращении пространства диагностических показателей местного иммунитета у больных ОЭ посредством кластерного анализа выделен 1-ый однородный кластер, сформированный иммуноглобулинами М и секреторным иммуноглобулином А (рис. 2). При высоком уровне объединения взаимодействуют лизоцим и компонента комплемента C_4 , образуя 2-й кластер для данных параметров иммунитета в вагинальноцервикальной слизи. В совокупности названные кластеры формируют 3-ий кластер. Значительный уровень интеграции установлен для иммуноглобулинов G и компонента комплемента C_3 , а также для компонента комплемента C_1 . Низкий уровень интеграции среди показателей местного иммунитета у пациенток с ОЭ выявлен для иммуноглобулинов А и компоненты комплемента C_5 . Следовательно, кластерный анализ доказывает высокую диагностическую значимость при ОЭ Ig M, секреторного иммуноглобулина А, лизоцима и компонента комплемента C_4 .

Анализ параметров информативности по Кульбаку выявил высокую информативность Ig M в вагинальноцервикальном секрете. У больных ОЭ на втором и третьем ранговых местах по величине информативности с незначительным различием находятся компонента комплемента C_4 и лизоцим. Важными с диагностической точки зрения среди показателей местного иммунитета при рассматриваемой патологии следует считать уровень sIg A ниже 0,25 г/л и компоненты комплемента C_1 более 50,0. Значительной является мера информативности

Ig G более 0,65 г/л, компоненты комплемента C_3 более 55,0. Наименьшая информативность свойственна компоненте комплемента C_5 менее 35,0.

Заключение. Оценка диагностической значимости показателей местного иммунитета у больных ОЭ посредством корреляционного и кластерного анализа свидетельствует, что ведущими параметрами для верификации данного заболевания являются содержание Ig M, sIg A, C_4 компонент комплемента, лизоцима в вагинальноцервикальной слизи. Названные выше иммунологические показатели имеют наибольшее число корреляций на внутрисистемном уровне и интегрированы в первый и второй кластеры при уровне объединения более 0,6, что однозначно указывает на их высокую диагностическую значимость.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Савельева Г.М., Серов В.Н., Сухих. Г.Т. *Акушерство и гинекология. Клинические рекомендации*. М.: ГЭОТАР Медиа; 2009.
2. Серов В.Н., Коган Е.А., Силантьева Е.С., Шуршалова А.В., Ежова Л.С., Дебольская А.И. Комплексное лечение хронического эндометрита: клиноморфологическое обоснование использования физиотерапии. *Акушерство и гинекология*. 2006; 3: 46-50.
3. Archer T.L., Shapiro A.E., Suresh P.J. Maximisation of maternal cardiac output during labour might help to prevent not only foetal hypoxaemia but also myometrial ischaemia, dysfunctional labour, uterine atony and postpartum endometritis. *Anaesth. Intensive Care*. 2011; 39(4): 774-5.
4. Bartolome J.A., Khalloub P., de la Sota R.L., Drillich M., Melendez P.G. Strategies for the treatment of dairy cows at high risk for postpartum metritis and for the treatment of clinical endometritis in Argentina. *Trop Anim Health Prod*. 2014;46(1):79-85.
5. Melcher Y., Prunner I., Drillich M. Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis. *Theriogenology*. 2014;82(1): 57-63.
6. Sukhikh G.T., Shurshalova A.V., Veryasov V.N. Immunomorphological characteristics of endometrium in women with chronic endometritis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006; 141(1): 104-6.
7. Tortorella C., Piazzolla G., Matteo M., Pinto V., Tinelli R., Sabbà C., et al. Interleukin 6, interleukin 1 β , and tumor necrosis factor α in menstrual effluents as biomarkers of chronic endometritis. *Fertil Steril*. 2014; 101(1): 242-7.
8. Белокриницкая Т.Е., Битковский Ю.А., Анохова Л.И., Фролова Н.И. Цитокины, субпопуляции лимфоцитов и фагоцитарная активность лейкоцитов при послеродовых эндометритах у пациенток молодого возраста. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН*. 2012; 3: 71 – 4.
9. Россиева Т.Л., Савченко А.А., Цхай В.Б. Особенности состояния иммунного статуса внутриклеточного метаболизма лимфоцитов крови после медицинского аборта при остром эндометрите. *Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск)*. 2007; 1: 48 – 51.
10. Куперт М.А. О патогенезе эндометритов после родов. *Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск)*. 2004; 7: 35 – 6.
11. Лебедева О.П., Самборская Н.И., Башмаков В.Ю. Пахомов С.П., Попов В.Н., Чурносоев М.И. и др. Роль системы врожденного иммунитета, генетических факторов антиоксидантных ферментов в патогенезе послеродового эндометрита. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2011; 16(111): 95 – 9.

REFERENCES

1. Savel'eva G.M., Serov V.N., Suhik G.T. *Obstetrics and gynecology. Clinical guidelines* [Akusherstvo i ginekologiya/ Klinicheskie rekomendatsii]. M.: GEOTAR Media; 2009. (in Russian)
2. Serov V.N., Kogan E.A., Silant'eva E.S., Shurshalova A.V., Ejhova L.S., Debolskaja A.I. Complex treatment of chronic endometritis: clinicomorphological rationale for the use of physiotherapy. *Akusherstvo i ginekologija*. 2006; 3: 46-50. (in Russian)
3. Archer T.L., Shapiro A.E., Suresh P.J. Maximisation of maternal cardiac output during labour might help to prevent not only foetal hypoxaemia but also myometrial ischaemia, dysfunctional labour, uterine atony and postpartum endometritis. *Anaesth. Intensive Care*. 2011; 39(4): 774-5.

4. Bartolome J.A., Khalloub P., de la Sota R.L., Drillich M., Melendez P.G. Strategies for the treatment of dairy cows at high risk for postpartum metritis and for the treatment of clinical endometritis in Argentina. *Trop. Anim. Health Prod.* 2014; 46(1): 79-85.
5. Melcher Y., Prunner I., Drillich M. Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis. *Theriogenology*. 2014; 82(1): 57-63.
6. Sukhikh G.T., Shurshalina A.V., Varyasov V.N. Immunomorphological characteristics of endometrium in women with chronic endometritis. *Bulleten' Experimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2006; 141(1): 104-6. (in Russian)
7. Tortorella C., Piazzolla G., Matteo M., Pinto V., Tinelli R., Sabbà C., et al. Interleukin6, interleukin1β, and tumor necrosis factor α in menstrual effluents as biomarkers of chronic endometritis. *Fertil Steril*. 2014; 101(1): 242-7.
8. Belokrinickaja T.E., Bitkovskij Ju.A., Anohova L.I., Frolova N.I. Cytokines, lymphocyte subpopulations and phagocytic activity of leukocytes in postpartum endometritis in patients of young age. *Bulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN*. 2012; 3: 71 – 4. (in Russian)
9. Rossieva T.L., Savchenko A.A., Chaj V.B. The peculiarities of the immune status of intracellular metabolism of blood lymphocytes after medical abortion under acute endometritis. *Sibirskij medicinskij zhurnal (g. Irkutsk)*. 2007; 1: 48 – 51. (in Russian)
10. Kupert M.A. On the pathogenesis of endometritis after birth. *Sibirskij medicinskij zhurnal (g. Irkutsk)*. 2004; 7: 35 – 6.
11. Lebedeva O.P., Samborskaya N.I., Bashmakov V.Ju. Pahomov S.P., Popov V.N., Churnosov M.I. et al. Role of the innate immune system, genetic factors, antioxidant enzymes in the pathogenesis of postpartum endometritis. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmaciya*. 2011; 16(111): 95 – 9. (in Russian)

Поступила 02.11.17
Принята к печати 25.01.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.835.12:579.222].083.3:543.544

Смирнова Д.Н., Богачева Н.В., Дармов И.В.

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОБРАЗЦА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА ПАТОГЕННОСТИ CagA *HELICOBACTER PYLORI*

ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», 610000, г. Киров, Россия

Разработана иммунохроматографическая тест-система для детекции белка патогенности CagA *Helicobacter pylori* в различном биологическом материале (кале, содержимом зубодесневых карманов), а также в культуре *H.pylori*. Тест-система представляет собой мультимембранный композит на основе мембран фирмы «MDI» (Индия). Основными иммунохимическими компонентами тест-системы являются: конъюгат наночастиц коллоидного золота размером 30 нм с моноклональными антителами (клон HP-387), нанесённый на мембрану для конъюгата; моноклональные антитела (клон HP-1811) и антивидовые антитела козы против Ig мыши, нанесённые на нитроцеллюлозную мембрану соответственно в тестовую и контрольную зоны. Все антитела производства фирмы «Биалекса» (Россия).

Ключевые слова: иммунохроматографическая тест-система; наночастицы коллоидного золота; моноклональные антитела; хеликобактериоз; *Helicobacter pylori*.

Для цитирования: Смирнова Д.Н., Богачёва Н.В., Дармов И.В. Разработка экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности CagA *Helicobacter pylori*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (4): 242-246. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-242-246>

Smirnova D.N., Bogacheva N.V., Darmov I.V.

THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL SAMPLE OF IMMUNE CHROMATOGRAPHIC TEST-SYSTEM FOR DETECTING PROTEIN OF PATHOGENICITY OF CagA *HELICOBACTER PYLORI*

The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Vyatka State University", 610000, Vyatka, Russia

The immunochromatographic test-system was developed for detecting protein of pathogenicity of CagA *Helicobacter pylori* in various biological samples (feces, content of dento-gingival recesses) and also in culture of *H.pylori*. The test-system represents multi-membrane composite on the basis of membranes manufactured by "MDI" (India). The main immunochemical components of test-system are conjugate of nanoparticles of colloid gold with size of 30 nm with monoclonal antibodies (clone HP-387), applied to membrane for conjugate; monoclonal antibodies (clone HP-1811) and anti-species antibodies of goat against Ig of mouse, applied to nitrocellulose membrane correspondingly in test and control zones. All antibodies are produced by the firm "Bialeksa" (Russia).

Key words: immune chromatographic test-system; nanoparticles of colloid gold; monoclonal antibodies; *Helicobacteriosis*; *Helicobacter pylori*.

For citation: Smirnova D.N., Bogacheva N.V., Darmov I.V. The development of experimental sample of immune chromatographic test-system for detecting protein of pathogenicity of CagA *Helicobacter pylori*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(4): 242-246. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-242-246>

For correspondence: Smirnova D.N., post-graduate student of the chair of Microbiology of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Vyatka State University", e-mail: cards1993@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support

Received 25.01.2018
Accepted 30.01.2018

Для корреспонденции: Смирнова Дарья Николаевна, аспирант каф. микробиологии ; e-mail: cards1993@mail.ru

Введение. По состоянию на сегодняшний день инфекция, вызываемая *Helicobacter pylori*, является одной из наиболее распространённых инфекций человека. По данным литературы, хеликобактериоз встречается у 80–90% жителей развивающихся стран Азии и Африки, 40–80% жителей Восточной Европы, Южной Америки и 25–40% населения развитых стран Европы и Северной Америки. Распространённость инфекции *H. pylori* среди взрослого населения в России составляет 84% [1].

Азиатско-Тихоокеанский консенсус по раку желудка рекомендовал стратегию скрининга и лечения хеликобактериоза в популяциях населения с высоким риском рака желудка [2]. На рис. 1 представлены статистические данные о частоте ассоциации заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) с *H. pylori* и процент малигнизации на фоне соответствующих заболеваний [3].

Сказанное выше определяет целесообразность внедрения стратегии скрининга и эрадикации *H. pylori* у лиц, имеющих в анамнезе заболевания ЖКТ.

Разработка иммунохроматографических тест-систем для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний является актуальным направлением исследования. Существует большое количество разработанных иммунохроматографических тест-систем, но нет чёткого алгоритма их изготовления. В каждом конкретном случае необходимо использовать свои комбинации специфических антител, буферных растворов, мембран [4].

В настоящее время на российском рынке существуют несколько иммунохроматографических тест-систем для диагностики хеликобактериоза. Однако они предназначены исключительно для качественного определения антигена в биологическом материале (чаще всего в кале). Примерами таких тест-систем являются «CITO TEST *H. pylori* Ag» («Certest Biotec», Испания), «ImmunoCard STAT HpSA» («Meridian Bioscience», Италия), «Хелико Стик» и «*H. pylori* тест» («Novamed», Израиль). Недостатком перечисленных иммунохроматографических тест-систем является их направленность на выявление фермента уреазы, который, кроме *H. pylori*, способны вырабатывать некоторые другие возбудители инфекционных заболеваний.

Известно, что наиболее эффективным подходом при лабораторной диагностике инфекций является детекция антигенов патогенности инфекционного агента. У *H. pylori* обнаружено несколько таких антигенов (CagA, VacA, IceA, BabA). Особое место среди них занимает белок CagA. Протеин CagA ассоциирован с язвенной болезнью, раком желудка и лимфомой. Считается, что CagA⁺-штаммы *H. pylori* и особенно CagA⁺VacA⁺-штаммы в значительно большей мере стимулируют пролиферативную активность эпителиоцитов слизистой оболочки желудка, чем CagA-негативные. Поступление в эпителиоциты слизистой оболочки желудка белка CagA вызывает мобилизацию и реорганизацию актина, индукцию ростковых факторов, продукцию различных цитокинов. Считается, что у таких пациентов риск развития кишечной метаплазии в 12 раз и атрофического гастрита в 3 раза выше, чем у инфицированных CagA-негативными штаммами. Генотип CagA⁺VacA⁺ достоверно чаще ассоциируется с гастродуоденальной язвой [5]. В связи с этим, детекция белков патогенности *H. pylori* и, в первую очередь, белка cagA является критерием отбора лиц для назначения эрадикационной терапии.

Отсутствие отечественных иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для выявления белков патогенности *H. pylori*, значимых для развития хеликобактерассоциированных заболеваний, определяет актуальность и цель работы.

Цель исследования – разработка экспериментальной образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности cagA *H. pylori*.

Материал и методы. Работа выполнена на базе кафедры

микробиологии Вятского государственного университета» (г. Киров).

В работе использовали моноклональные антитела (МкАТ) к белку CagA *H. pylori*, клоны HP-1811 и HP-387 («Биалекса», Россия); антивидовые антитела козы против IgG мыши («Биалекса», Россия); золотохлористоводородную кислоту $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma, США); деионизированную воду (ГОСТ 11.029.003-80); соляную кислоту (ГОСТ 3118-77); азотную кислоту (ГОСТ 4461-77); цитрат натрия 5,5-водный («Реахим», Россия); хлорид натрия («Реахим», Россия); карбонат калия («Реахим», Россия); гидрокарбонат натрия («Реахим», Россия); дигидрофосфат калия (Panreac, Испания); гидрофосфат натрия (Sciphos, Китай); трис(гидрохсиметил)аминометан (Sigma, США); трис гидрохлорид (Panreac, Испания); полиэтиленгликоль 40 000 (Sigma, США); бычий сыvorоточный альбумин («Диа-М», Германия); Tween-20 (AppliChem, Германия); сахарозу («Реахим», Россия).

Все растворы готовили на деионизированной воде.

Мультимембранный комплекс разработан на основе мембран фирмы MDI (Индия).

При разработке иммунохроматографической тест-системы использовано следующее оборудование: весы электронные аналитические Adventurer (OHAUS, США); электронный трансмиссионный микроскоп JEM-2100 (Jeol, Япония); спектрофотометр сканирующий «СПЕКС ССП-705-4» (ЗАО «Спектроскопические системы», Россия); центрифуга лабораторная Centrifuge 5415 R (Eppendorf, Германия); центрифуга-вортекс «Микроспин» (Biosan, Латвия); термостат «ТСО-1/80» («СПУ», Россия); магнитная мешалка (Heidolph, Германия); резак для бумаги (Rahmenlos® Katze Geschenk Shirt, США); pH-метр «pH-410» («Аквилон», Россия); система для получения деионизированной воды Agium 611 UF (Sartorius, Германия).

Для оценки чувствительности были использованы культуры *H. pylori* из коллекции культур кафедры микробиологии.

Культуры *H. pylori* выращивали на селективной питательной среде – колумбийском кровяном агаре с антибиотиками амфотерицином и ванкомицином в анаэробе при температуре 37°C в течение 3–5 сут. Принадлежность культур к *H. pylori* подтверждена бактериологическим и биохимическим методами, методом ПЦР при использовании коммерческих тест-систем «Хеликопол VA», «Хеликопол СА», «Хеликопол IA», «Хеликопол ВА» (Россия), «ДНК-технологии» (Россия), методом иммунохроматографии при использовании коммерческой тест-системы NovaMed (Израиль).

Для оценки специфичности использовали культуру *Proteus vulgaris* из коллекции культур кафедры микробиологии Вятского государственного университета. Культуру выращивали на мясопептонном агаре в термостате при температуре 37°C в течение суток. Принадлежность культуры к *P. vulgaris* была подтверждена биохимическими и микробиологическими методами.

Оптическую концентрацию микробных клеток в суспензиях определяли с использованием отраслевого стандарта мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (ОСО 42-28-85П).

Биологическую концентрацию клеток в агаровой культуре *H. pylori* определяли, как описано в работе чашечным методом Коха, используя для расчёта формулу (1):

$$M = (a \times 10^n) / V, \quad (1)$$

где M – количество клеток в 1 см³ исследуемого субстрата, м.к. · см⁻³;

a – среднее число колоний при высеве из данного разведения, шт.;

10 – коэффициент разведения;

n – порядковый номер разведения, из которого сделан высеv;

V – объём суспензии, взятой для посева, см³.

Погрешность измерения рассчитывали по формуле (2) [6]:

$$I95 = 2a/r, \quad (2)$$

где a – среднее число колоний, выросших на чашках Петри, шт.;

r – число повторностей посева;

2 – постоянный коэффициент.

Результаты и обсуждение. Наночастицы коллоидного золота (НЧКЗ) со средним диаметром 25–30 нм получали цитратным методом Френса с модификациями.

Размеры, дисперсионные свойства, электронную плотность частиц анализировали на электронном трансмиссионном микроскопе.

Определение «золотого числа» проводили по стандартной методике [7], для этого к раствору МкАТ НР-387 (с концентрацией от $100 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ до $1,5 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$) добавляли в равных объёмах раствор НЧКЗ, перемешивали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Затем вносили 10% раствор хлорида натрия, перемешивали и через 10 мин измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 630 нм (OD_{630}) на спектрофотометре.

Концентрацию антител, используемую при синтезе конъюгатов МкАТ с НЧКЗ, устанавливали на основании флокуляционной кривой, отражающей агрегацию конъюгатов при высокой ионной силе. Была выбрана концентрация антител, на 10–15% превосходящая точку выхода кривой OD_{630} на плато, как рекомендовано в работе [7], а именно $20 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$.

Для приготовления конъюгата МкАТ НР-387, разведённые в 0,025 М трис-буфере, смешивали с равным объёмом раствора НЧКЗ до конечной концентрации МкАТ $20 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$. Конъюгат инкубировали 30 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая на вортексе. Для стабилизации добавляли профильтрованный 4% раствор полиэтиленгликоля и инкубировали 15 мин. Конъюгат центрифугировали дважды с ускорением 9000 g в течение 30 мин при температуре 4°C . После второго центрифугирования супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в стабилизирующем буфере, содержащем 0,025 М трис, 1% бычий сывороточный альбумин и 1% сахарозу.

Раствор конъюгата методом пропитывания наносили на мембрану для конъюгата с плотностью нанесения 30 мкл на 1 см^2 и высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение суток.

Для получения иммунохроматографического композита последовательно проводили склеивание тест-системы: на нитроцеллюлозную мембрану наклеивали мембрану с иммобилизованным конъюгатом, мембрану для образца и мембрану для адсорбента. Затем полученный мультимембранный композит нарезали при помощи резака на отдельные полоски шириной 3,5–4,0 мм.

После этого на нитроцеллюлозную мембрану вручную, используя наконечник и микропипеточный дозатор, наносили МкАТ: в тестовую зону – МкАТ НР-1811 в концентрации $12 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$, в контрольную зону – антивидовые антитела козы против иммуноглобулинов мыши в концентрации $10 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$. Тест-системы высушивали при комнатной температуре в течение суток.

Таким образом был изготовлен экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы, состав мультимембранного композита и основные компоненты которого представлены на рис. 2.

Работоспособность тест-системы оценили путём тестирования различного биологического материала на предмет наличия в них белка патогенности CagA *H. pylori*.

На первом этапе оценивали чувствительность тест-системы, используя культуру *H. pylori*, выращенную на селективной питательной среде в чашках Петри. Культуру *H. pylori* смывали с поверхности агара стерильным раствором хлорида натрия. Для осаждения клеток и удаления компонентов от остатков питательной среды суспензию

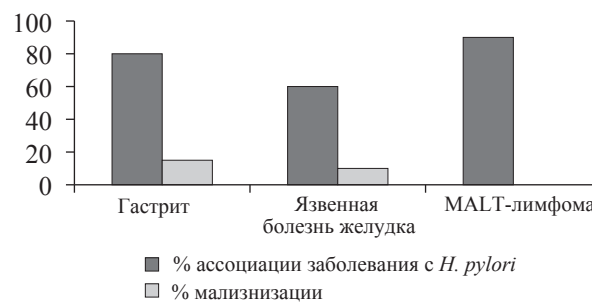


Рис. 1. Частота ассоциации заболеваний ЖКТ с *H. pylori* и процент малигнизации на фоне соответствующих заболеваний.

клеток центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в буфере разгона, приготовленном на 0,025 М К/Na фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,15 М NaCl и 0,05 % Tween-20. После определения оптической концентрации клеток, используя буфер разгона, делали ряд последовательных разведений суспензии: $1 \cdot 10^{10}$, $5 \cdot 10^9$, $2,5 \cdot 10^9$, $1,25 \cdot 10^9 \text{ м.к.} \cdot \text{см}^{-3}$.

По результатам проведенных исследований порог чувствительности тест-системы составил $2,5 \cdot 10^9 \text{ м.к.} \cdot \text{см}^{-3}$, о чём свидетельствовало появление розовой точки в аналитической зоне. Появление окрашенной (розовой) точки в контрольной зоне указывало на корректность проведенного исследования.

Был определен также порог чувствительности тест-системы по биологической концентрации, т.е. по отношению к живым микробным клеткам, содержащимся в агаровой суспензии. Его значение составило $(1,7 \pm 4,8) \cdot 10^8 \text{ КОЕ} \cdot \text{см}^{-3}$. Более высокая чувствительность анализа, рассчитанная по биологической концентрации в сравнении с таковой, определенной по оптической концентрации микроорганизмов, возможно, связана с тем, что белок CagA имеет внутриклеточную локализацию. Для подтверждения этой гипотезы нужны дополнительные исследования.

Для оценки специфичности использовали буфер разгона и культуру *P.vulgaris*.

Данный микроорганизм также является этиологическим агентом заболеваний ЖКТ и присутствует в кишечнике здорового человека и многих животных. Культуру *P.vulgaris* для исследования готовили, как описано выше. После определения в полученной суспензии оптической концентрации клеток, используя буфер разгона, делали ряд последовательных разведений: $1 \cdot 10^{10}$, $5 \cdot 10^9$, $2,5 \cdot 10^9 \text{ м.к.} \cdot \text{см}^{-3}$.

При тестировании гетерологичной культуры *P.vulgaris* в исследуемых концентрациях, а также при тестировании буфера разгона окрашивания аналитической зоны не наблюдалось

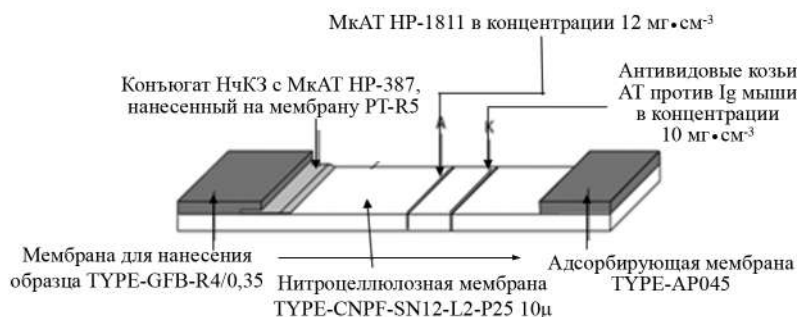


Рис. 2. Внешний вид и основные компоненты разработанного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы, предназначенной для выявления белка патогенности CagA *H. pylori*.

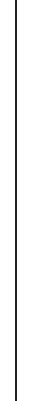
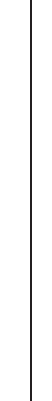
Конт- роль	Культура <i>Helicobacter pylori</i> в концентрации ..., м.к. × см ⁻³				Культура <i>Proteus vulgaris</i> в концентрации ..., м.к. × см ⁻³	
	1 × 10 ¹⁰	5 × 10 ⁹	2,5 × 10 ⁹	1,25 × 10 ⁹	1 × 10 ¹⁰	1,25 × 10 ⁹
-	++	++	+	-	-	-
						
Примечание: 1. «++», «+» – степень интенсивности окраски аналитической зоны; 2. «-» – отсутствие окраски аналитической зоны.						

Рис. 3. Проверка чувствительности и специфичности экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы.

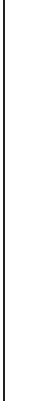
Контроль	Серонегативный донор	Донор № ...				
		1	7	13	15	20
-	-	-	++	-	+	-
						
Примечание: 1. «++», «+» – степень интенсивности окраски аналитической зоны; 2. «-» – отсутствие окраски аналитической зоны.						

Рис.4. Оценка работоспособности иммунохроматографической тест-системы при исследовании биологического материала (кала) на наличие антигена *H.pylori*.

(рис. 3), что свидетельствовало о специфичности разработанного образца иммунохроматографической тест-системы.

На втором этапе оценили возможность использования тест-системы для качественного исследования биологического материала (кала и содержимого зубодесневых карманов), взятого от серопозитивных по отношению к *H.pylori* доноров, на наличие белка CagA *H.pylori*.

Для этого провели забор крови из локтевой вены у 20 добровольцев, с которыми заранее было подписано добровольное соглашение на участие в исследовании. Сыворотку крови добровольцев протестировали на наличие антител к белку CagA *H.pylori* с помощью коммерческого набора для ДОТ-анализа «Хелико-экспресс» («ВЕКТОР-БЕСТ», Россия).

По результатам исследования были выбраны 5 серопозитивных доноров, образцы кала которых протестировали на наличие белка CagA *H.pylori*. В качестве отрицательного контроля использовали буфер разгона.

По результатам тестирования в двух из пяти исследованных образцов (донор № 7 и донор № 15) обнаружен белок CagA *H.pylori*, о чём свидетельствовало появление розовой точки в аналитической зоне, а окрашивание контрольной зоны подтверждало корректность проведенного исследования (рис. 4).

Ротовая полость является входными воротами *H. pylori*-инфекции. В ротовой полости инфицированных людей возбудитель обнаруживается в слюне, на слизистой оболочке, на дентальных бляшках, в зубном налёте, в зубодесневых карманах. В последних создаются микроаэрофильные условия, благоприятные для *H. pylori* [8–10]. В связи с этим представляется целесообразным изучить содержимое зубодесневых карманов на наличие белка CagA *H.pylori*.

Поэтому параллельно с тестированием кала у серопозитивных по белку cagA лиц проводили тестирование содержимого зубодесневых карманов. Забор биологического материала из зубодесневых карманов маляров и резцов осуществляли стерильными штифтами. Отобранный материал ресуспендировали в 1,5 см³ буфера разгона, полученную суспензию центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин для осаждения биологического материала, а затем полученный осадок ресуспендировали в 0,15 см³ буфера разгона. Подготовленный таким образом материал тестировали на наличие белка CagA *H.pylori*, используя разработанную иммунохроматографическую тест-систему. Параллельно проводили посев биологического материала на селективную питательную среду.

По результатам исследования пяти образцов содержимого зубодесневых карманов положительная реакция выявлена всеми указанными методами у добровольцев № 7 и № 15, у которых положительный результат был получен также и при тестировании кала.

Таким образом, результаты исследования различного биологического материала (образцов кала, содержимого зубодесневых карманов) показали, что только двое из пяти серопозитивных пациентов, у которых выявлено наличие патогенных штаммов *H.pylori*, продуцирующих белок CagA, нуждаются в назначении эрадикационной терапии. Трое серопозитивных лиц имели в анамнезе хеликобактериоз, однако на момент обследования не являлись носителями патогенных штаммов *H.pylori*, содержащих белок CagA, и не нуждались в назначении многокомпонентной антибактериальной терапии.

Выводы

Разработан экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы, предназначенной для детекции белка патогенности CagA *H.pylori*, основными иммунохимическими компонентами которого являются наночастицы коллоидного золота и моноклональные антитела отечественного производства.

Экспериментально доказана способность иммуно-

ромографической тест-системы выявлять белок CagA *H. pylori* в культуре *H. pylori* и в различном биологическом материале – в кале и содержимом зубодесневых карманов у лиц, имеющих в анамнезе гастрит или язвенную болезнь желудка.

Показана возможность использования разработанной тест-системы для подтверждения полноты эрадикации *H. pylori* после проведения курса антибактериальной терапии у пациентов с хеликобактериозами по результатам исследования кала и содержимого зубодесневых карманов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маев И.В., Самсонов А.А., Андреев Д.Н., Гречушников В.Б., Корovina Т.И. Клиническое значение инфекции *Helicobacter pylori*. *Клиническая медицина*. 2013; 8: 4-12.
2. Лазебник Л.Б., Васильев Ю.В., Щербakov П.Л., Хомерики С.Г., Машарова А.А., Бордин Д.С. и др. *Helicobacter pylori*: распространенность, диагностика, лечение. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2010; 2: 3-7.
3. Статистика рака желудка. URL: <http://www.oncoforum.ru/o-rake/statistika-raka/statistika-raka-zheludka.html> (дата просмотра 24.05.2016).
4. Смирнова Д.Н., Крупина К.А., Богачева Н.В., Дармов И.В. Сравнительная оценка компонентов иммунохроматографических тест-систем, используемых для их разработки. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (1): 30-4.
5. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Л.: МЕДГИЗ, 1962.
6. Угольник Т.С. Сравнительный анализ выявления *Helicobacter pylori* в ротовой полости с помощью тест-зонда и полимеразной цепной реакции. *Медицинские новости*. 2006; 1(8): 90-2.
7. Чобанов Р.Э., Мамедов Р.М. Пародонтальные карманы как биотопы накопления и жизнедеятельности *Helicobacter pylori*. *Сибирский медицинский журнал*. 2008; 7: 72-3.

10. Булкина Н.В. Патогенетическая взаимосвязь и взаимовлияние воспалительных заболеваний пародонта с патологией сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта. *Клиническая стоматология*. 2010; 2: 12-5.

REFERENCES

1. Maev I.V., Samsonov A.A., Andreev D.N., Grechushnikov V.B., Korovina T.I. Clinical significance of *Helicobacter pylori* infection. *Klinicheskaya meditsina*. 2013; 8: 4-12. (in Russian)
2. Lazebnik L.B., Vasil'ev Yu.V., Shcherbakov P.L., Homeriki S.G., Masharova A.A., Bordin D.S. et al. *Helicobacter pylori*: prevalence, diagnosis, treatment. *Jeksperimental'naja i klinicheskaya gastrojenterologiya*. 2010; 2: 3-7. (in Russian)
3. Stomach cancer statistics [Statistika raka zheludka]. Available at: <http://www.oncoforum.ru/o-rake/statistika-raka/statistika-raka-zheludka.html> (accessed 24.05.2016). (in Russian)
4. Smirnova D.N., Krupina K.A., Bogacheva N.V., Darmov I.V. Comparative evaluation of components of immunochromatographic test systems used for their development. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62 (1): 30-4. (in Russian)
5. Citty D.M., Huertas M.G., Martinez J.D. *Helicobacter pylori* genotypes in non atrophic gastritis are different of the found in peptic ulcer, premalignant lesions and gastric cancer in Colombia. *Rev. Med. Chil*. 2002; 130 (2): 143-51.
6. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. Statistical methods in microbiological studies [Statisticheskiye metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]. Leningrad: MEDGIZ; 1962. (in Russian)
7. Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques. Amsterdam: Acad. Press, Elsevier; 2008.
8. Ugol'nik T.S. Comparative analysis of the detection of *Helicobacter pylori* in the oral cavity using a test probe and a polymerase chain reaction. *Meditsinskie novosti*. 2006; 1(8): 90-2. (in Russian)
9. Chobanov R.E., Mamedov R.M. Parodontal pockets as biotopes of accumulation and vital activity of *Helicobacter pylori*. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2008; 7: 72-3. (in Russian)
10. Pathogenetic interrelation and mutual influence of inflammatory periodontal diseases with the pathology of the cardiovascular system and the gastrointestinal tract. *Klinicheskaya stomatologiya*. 2010; 2: 12-5. (in Russian)

Поступила 25.01.18

Принята к печати 30.01.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 617.7-007.681-037-078.33

Сахнов С.Н.¹, Харченко В.В.²

ДИАГНОСТИКА И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ГЛАУКОМЫ

¹Краснодарский филиал ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ, 350012, Краснодар, Россия;

²ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», 305041, Курск, Россия

Глаукома является ведущей причиной необратимой слепоты во всех странах и в ближайшие годы прогнозируется увеличение больных с данной патологией. В настоящее время развитие заболевания связывают с изменением интерлейкинового профиля в слезной жидкости, но диагностическая значимость интерлейкинов (IL) изучена недостаточно. Цель работы – определение диагностической значимости IL на местном уровне для улучшения диагностики и прогнозирования развития глаукомы. Содержание IL в слезной жидкости изучено у 80 больных глаукомой II стадии и 45 практически здоровых лиц методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа с расчетом информативности показателей иммунитета. Результаты. Установлена высокая диагностическая значимость для верификации глаукомы IL-2, IL-17, IL-8, которые предлагается использовать при лабораторной диагностике и прогнозировании заболевания. Созданная регрессионная модель обеспечивает с высокой точностью прогнозирование развития глаукомы при повышении уровня IL-2, IL-17, IL-8.

Ключевые слова: глаукома; интерлейкины; лабораторная диагностика; прогнозирование.

Для цитирования: Сахнов С.Н., Харченко В.В. Диагностика и прогнозирование глаукомы. *Клиническая лабораторная диагностика* 2018; 63 (4): 246-249. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-246-249>

Sakhnov S.N.¹, Kharchenko V.V.²

THE DIAGNOSTIC AND PROGNOSTICATION OF GLAUCOMA

Для корреспонденции: Сахнов Сергей Николаевич, канд. мед. наук; e-mail: office@okocentr.ru

¹The Krasnodar Branch of the Federal State Self-Contained Institution "The S.N. Fedorov Interbranch Scientific and Technical Complex "Eye Microsurgery" of Minzdrav of Russia, 350012, Moscow, Russia

²The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kursk State Medical University", 305041, Kursk, Russia

The glaucoma is a leading cause of irreversible blindness in all countries. In the nearest years an increasing of patients with the given pathology is prognosticated. Nowadays, development of disease is related to alteration of interleukin profile in lacrimal fluid. however, diagnostic significance of interleukins is studied insufficiently.

The purpose of study. To determine diagnostic significance of interleukins on a local level for amelioration of diagnostic and prognostication of development of glaucoma. The content of interleukins in lacrimal fluid was analyzed in 80 patients with glaucoma stage II and 45 healthy individuals using technique of sandwich-linked enzyme-linked immunosorbent assay with calculation of informativeness of indices of immunity.

The results. The analysis established high diagnostic significance of IL-2, IL-17, IL-8 for verification of glaucoma. They are proposed to be applied in laboratory diagnostic and prognostication of disease. The developed regression model ensures with high accuracy prognostication of development of glaucoma in case of increased level of IL-2, IL-17, IL-8.

Key words: *glaucoma; interleukins; laboratory diagnostic; prognostication.*

For citation: Sakhnov S.N., Kharchenko V.V. The diagnostic and prognostication of glaucoma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(4): 246-249. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-246-249>

For correspondence: Sakhnov S.N., candidate of medical sciences of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Kursk State Medical University", e-mail: office@okocentr.ru

Information about author:

Sakhnov S.N., <http://orcid.org/0000-0003-2100-2972>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 01.12.2017

Accepted 13.12.2017

Глаукома относится к числу социально значимых заболеваний, поскольку является ведущей причиной необратимой слепоты во всем мире [1, 2]. По данным международных публикаций, в мире насчитывается от 5 до 10 млн человек, которые ослепли вследствие глаукомы [3–5]. В структуре причин слепоты доля глаукомы остаётся стабильно большой – от 14–15% в России и Югославии до 33% в Норвегии [6].

Глаукома является не только тяжёлым, но и распространённым заболеванием глаз. В 2010 г. в мире насчитывалось 60,5 млн больных глаукомой, а по прогнозу к 2020 г. число таких пациентов может достичь 80 млн [5]. Относительно высокая распространённость глаукомы во всех странах мира и её место в структуре слепоты и слабо зрения побуждают исследователей проводить новые эпидемиологические и диагностические исследования этого заболевания [7].

Проводимая диагностика глаукомы по параметрам внутриглазного давления не всегда является результативной. В единичных исследованиях последних лет показано, что при диагностике глаукомы необходимо учитывать содержание интерлейкинов (IL) в слёзной жидкости [8]. Однако неизученной остаётся диагностическая значимость IL и их информативность. Кроме того, отсутствует научная информация о прогностичности IL у больных глаукомой.

Цель выполненной работы – определение диагностической значимости IL на местном уровне для улучшения диагностики и прогнозирования развития глаукомы.

Материал и методы. Обследовано 80 больных первичной открытоугольной глаукомой II стадии в Краснодарском филиале «МНТК Микрохирургия глаза им. академика С.Н. Федорова». Средний возраст больных глаукомой 60,2±2,7 года. Контролем служили 45 практически здоровых лиц, возраст которых равен 57,8±3,1 года.

Цитокины в слёзной жидкости определяли на иммуноферментном анализаторе Multiscan (Финляндия), используя сэндвич-вариант твердофазного иммуноферментного анализа и тест-систему R&D Diagnostic Inc (США). Обработка данных выполнялась на ЭВМ с применением пакета Statistica 6.0. Расчёт информативности проводился по общепринятой формуле

$$J = 10 \lg 0,5 \cdot (P_1 - P_2),$$

где J – информативность, P_1 – частота признака в контроле, P_2 – частота этого же признака у больных глаукомой.

Результаты и обсуждение. Изучение цитокинового статуса в слёзной жидкости пациентов с глаукомой позволило обнаружить достоверные изменения уровня всех IL в сравнении с контрольной группой (табл. 1). При этом выявлена важная закономерность изменений содержания исследованных IL при сформировавшейся глаукоме – репрезентативное повышение практически всех IL за исключением IL-10, концентрация которого понизилась в 3 раза.

В слёзной жидкости больных глаукомой отмечено максимальное повышение содержания IL-8 и IL-2, оно статистически значимо возросло – в 8,2 и 7,8 раза соответственно. Существенным является также повышение уровня IL-17 при развитии глаукомного процесса. В равной степени, но менее значительно у пациентов с глаукомой повышен уровень IL-4, IL-7. Следует отметить, что изменение содержания противовоспалительных IL носило разнонаправленный характер – уровень IL-4 достоверно повысился у больных глаукомой, а уровень IL-10 репрезентативно снизился в этой же группе. Среди изученных IL слёзной жидкости наименьшее изменение свойственно IL-18, его уровень репрезентативно выше у пациентов с глаукомой, чем в контрольной группе.

В ранее выполненных исследованиях также показано, что локальный профиль цитокинов при первичной открытоугольной глаукоме отличается выраженной провоспалительной направленностью [9, 10]. У больных с начальной стадией глаукомы и подозрением на глаукому выявляется повышенный уровень провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-17, ФНОα в слёзной жидкости [10].

Изменения цитокинового профиля слёзной жидкости у пациентов с подозрением на глаукому существенно отличаются от такового в контроле и касаются 14 из 16 цитокинов, исключение составляют IL-8 [11]. Так, среди обследованных с подозрением на глаукому обнаружено статистически значимое повышение концентрации IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17. У пациентов с начальной глаукомой выявлено достоверное увеличение локальной продукции IL-1β, IL-5,

Таблица 1

Содержание интерлейкинов в слёзной жидкости у пациентов с глаукомой и в контроле ($M \pm t$)

Интерлейкин	Больные глаукомой	Контрольная группа
IL-2	18,9 $\pm$ 1,3	2,4 $\pm$ 0,3
IL-4	12,7 $\pm$ 0,9	3,8 $\pm$ 0,4
IL-6	71,5 $\pm$ 3,3	18,2 $\pm$ 1,7
IL-7	9,4 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 0,2
IL-8	27,9 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,3
IL-10	4,2 $\pm$ 0,2	12,5 $\pm$ 0,6
IL-17	31,6 $\pm$ 1,8	4,9 $\pm$ 0,4
IL-18	1415,7 $\pm$ 6,5*	568,3 $\pm$ 7,2
IL-1 β	210,8 $\pm$ 4,8*	74,9 $\pm$ 3,6

Примечание. Различия всех показателей у больных глаукомой в сравнении с таковыми в контрольной группе статистически значимы.

Таблица 2

Информативность интерлейкинов слёзной жидкости у больных с глаукомой

Интерлейкин	Величина информативности	Ранговое место
IL-2	592,5	1-е
IL-4	252,4	7-е
IL-7	285,7	5-е
IL-8	544,7	3-е
IL-10	324,9	4-е
IL-17	578,4	2-е
IL-18	234,5	8-е
IL-1 β	198,7	9-е
IL-6	270,9	6-е

IL-18 [11]. Однако в исследовании Е.В. Маркеловой и соавт. [3] при I стадии глаукомы определены гиперпродукция IL-17 и IL-10, умеренное повышение уровня IL-1 β .

Погрессирование глаукомы сопровождается увеличением синтеза провоспалительных цитокинов [10]. У больных глаукомой II стадии установлено повышение уровня IL-2, его растворимого рецептора. Содержание IL-6 и IL-4 находится в границах нормы [3].

На III стадии заболевания зафиксировано увеличение содержания как «ранних», так «поздних» провоспалительных цитокинов – IL-1 β и IL-6 – и повышенные, как и на II стадии, уровни IL-17 и IFN γ . Выявлено относительное снижение (до референсных величин) локальной концентрации IL-2 и его растворимого рецептора, что может свидетельствовать об истощении их продукции или повышенном образовании соответствующих комплексов [12].

Оценка противовоспалительных медиаторов в слёзной жидкости при далеко зашедшей глаукоме показала изменение баланса в сторону усиления продукции и секреции большинства из них: в 4 раза увеличился уровень IL-4, умеренно повышалось содержание IL-10. Отличительный признак этой стадии болезни – увеличение уровня IFN γ и IL-4 с превалированием последнего [12].

Анализ полученных данных позволил авторам сделать заключение о том, что в патогенезе глаукомы существенную роль играют повышение продукции провоспалительных интерлейкинов в слёзной жидкости и хроническое внутриглазное воспаление [3, 9, 13].

Выполненная нами оценка информативности интерлейки-

нов в слёзной жидкости у больных глаукомой позволила выделить диагностически значимые показатели (табл. 2). Максимальные параметры информативности свойственны IL-2 и IL-17. Высокой информативностью у пациентов с глаукомой характеризуются IL-8. Несмотря на существенную информативность других интерлейкинов, она значительно ниже, чем у IL-2, IL-17 и IL-8. В частности, информативность IL-10 составляет 324,9 и занимает 4-е ранговое место среди всех изученных интерлейкинов. Приблизительно равную меру информативности имеют IL-7 и IL-6. Минимальный уровень информативности установлен для IL-1 β . Основываясь на величинах информативности локального интерлейкинового профиля, для лабораторной диагностики глаукомы следует использовать определение в слёзной жидкости IL-2, IL-17, IL-8.

Используя данные интерлейкины, методом пошаговой регрессии разработали регрессионную модель для прогнозирования развития глаукомы: $y = 7,815 + 3,972x_1 + 2,467x_2 + 2,231x_3$,

где y – развитие глаукомы, x_1 – содержание в слёзной жидкости IL-2,

x_2 – содержание в слёзной жидкости IL-17, x_3 – уровень в слёзной жидкости IL-8.

Созданная математическая модель адекватна по критерию Фишера, так как $F_{\text{расч}} = 85,7$, $p < 0,001$. В соответствии с данной моделью развитие глаукомы прогнозируется при $y = 37,022-223,087$, а отсутствие данного заболевания – при $y < 37,021$.

Прогностически неблагоприятными локальными критериями и ранними маркерами диагностики глаукомы другие авторы называют повышение уровня IL-17 более 27 пг/мл [3]. Кроме того, указывается, что определение провоспалительных IL в слёзной жидкости в сочетании с данными клинко-офтальмологического обследования может использоваться для ранней диагностики и оценки степени тяжести глаукомы [10].

Заключение. Развитие глаукомы сопровождается репрезентативным увеличением содержания в слёзной жидкости практически всех IL, за исключением IL-10. Наибольшей диагностической значимостью обладают IL-2, IL-17, IL-8, которые рекомендуется определять при лабораторной диагностике и прогнозировании глаукомы. Созданная регрессионная модель с высокой безошибочной вероятностью позволяет прогнозировать развитие глаукомы по изменению содержания в слёзной жидкости IL-2, IL-17, IL-8.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Маркелова Е.В., Хохлова А.С., Кириенко А.В., Филина Н.В., Серебрянная Н.Б. Особенности иммунопатогенеза и дополнительные дифференциальные маркеры первичной открытоугольной и первичной закрытоугольной глауком. *Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке.* 2016; 18(2): 613-21.
- Бирич Т.А. Современные тенденции в лечении глауком. *Рецепт.* 2007;44(54): 40-4.
- Чердиченко Л.П., Барычева Л.Ю., Берновская А.А. Цитокиновый профиль у пациентов с начальными проявлениями первичной открытоугольной глаукомы. *Российская педиатрическая офтальмология.* 2013; 1:38-42.
- Чердиченко Л.П., Барычева Л.Ю., Берновская А.А. Значение провоспалительных цитокинов в развитии первичной открытоугольной глаукомы. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2013; 8(2): 52-4.
- Слепова О.С., Арапиев М.У., Ловпаче Дж.Н. Балацкая Н.В., Куликова И.Г. Особенности местного и системного цитокинового статуса у здоровых разного возраста и пациентов с начальной стадией первичной открытоугольной глаукомы. *Национальный журнал глаукома.* 2016; 15(1): 3-12.

12. Хохлова А.С., Кириенко А.В., Филина Н.В., Маркелова Е.В. Локальная цитокиновая регуляция на разных стадиях первичной открытоугольной глаукомы. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2014; 4: 46-8.
13. Еричев В.П., Петров С.Ю., Суббот А.М., Волжанин А.В., Германова В.Н., Карлова Е.В. Роль цитокинов в патогенезе глазных болезней. *Национальный журнал глаукома*. 2017; 16(1): 85-99.

REFERENCES

1. Wostyn P., DeGroot V., VanDam D., Audenaert K., EsrielKiller H., DeDeyn P.P. Theglymphatic hypothesis of glaucoma: a unifying concept incorporating vascular, biomechanical, and biochemical aspects of the disease. *Biomed. Res. Int.* 2017; 5123148.
2. Levkovitch-Verbin H., Goldstein I., Chodick G., Zigman N., Shalev V. The Maccabi Glaucoma Study: prevalence and incidence of glaucoma in a large Israeli health maintenance organization. *Am.J.Ophthalmol.* 2014; 158(2): 402-8.
3. Markelova E.V., Hohlova A.S., Kirienko A.V., Filina N.V., Serebryannaya N.B. Features of the immunopathogenesis and the additional differential markers of primary open angle and primary angle closure glaucoma. *Zhurnal nauchnykh statey Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*. 2016; 18(2): 613-21. (in Russian)
4. Zhao Y., Fu J.L., Li Y.L., Li P., Lou F.L. Epidemiology and clinical characteristics of patients with glaucoma: An analysis of hospital data between 2003 and 2012. *Indian J Ophthalmol.* 2015; 63(11): 825-31.
5. Tham Y.C., Li X., Wong T.Y., Quigley H.A., Aung T., Cheng C.Y. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: A systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology*. 2014; 121: 2081-90.
6. Birich T.A. Modern trends in the treatment of glaucoma. *Retsept*. 2007; 44(54): 40-4. (in Russian)
7. Lazcano-Gomez G., Soohoo J., Lynch A., N Bonell L., Martinez K., Turati M. et al. Neovascular glaucoma: a retrospective review from a tertiary eye care center in Mexico. *J. Curr. Glaucoma Pract.* 2017; 11(2): 48-51.
8. Yang X., Luo C., Cai J., Powell D.W., Yu D., Kuehn M.H., Tezel G. Neurodegenerative and inflammatory pathway components linked to tnfr1 signaling in the glaucomatous human retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011. 52(11): 8442-54.
9. Cherednichenko L.P., Barycheva L.Yu., Bernovskaya A.A. Cytokine profile in patients with initial manifestations of primary open-angle glaucoma. *Rossiyskaya pediatricheskaya oftal'mologiya*. 2013; 1: 38-42. (in Russian)
10. Cherednichenko L.P., Barycheva L.Yu., Bernovskaya A.A. Importance of proinflammatory cytokines in the development of primary open-angle glaucoma. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2013; 8(2): 52-4. (in Russian)
11. Slepova O.S., Arapiey M.U., Lovpache Dzh.N. Balackaya N.V., Kulikova I.G. Peculiarities of local and systemic cytokine status in healthy of different age and patients with initial stage of primary open-angle glaucoma. *Natsional'nyi zhurnal glaukoma*. 2016; 15(1): 3-12. (in Russian)
12. Khokhlova A.S., Kirienko A.V., Filina N.V., Markelova E.V. Local cytokine regulation at different stages of primary open-angle glaucoma. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 4: 46-8. (in Russian)
13. Eriчев V.P., Petrov S.Yu., Subbot A.M., Volzhanin A.V., Germanova V.N., Karlova E.V. Rol' tsitokinov v patogeneze glaznykh bolezney. *Natsional'nyi zhurnal glaukoma*. 2017; 16(1): 85-99. (in Russian)

Поступила 01.12.17

Принята к печати 13.12.17

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.842.11.083.1

Карцев Н.Н.¹, Светоч Э.А.¹, Ершова М.Г.², Абросимова Г.Н.², Тазина О.И.¹, Пинчук А.С.¹, Фурсова Н.К.¹, Шепелин А.П.¹, Дятлов И.А.¹

ХАРАКТЕРИСТИКА ДИАРЕЕГЕННЫХ ЭШЕРИХИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ ДО 5 ЛЕТ В г. ЯРОСЛАВЛЕ

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, п. Оболенск, Московская область, Россия;

²ГБУЗ «Ярославская областная инфекционная клиническая больница № 1», Ярославль, Россия

Диареегенные бактерии *Escherichia coli* (кишечная палочка) занимают значимое место среди бактериальных возбудителей острых кишечных инфекций (ОКИ) у детей в возрасте до 5 лет. Наибольшую опасность среди этих патогенов представляют энтеротоксигенные *E. coli*, вызывающие энтериты и энтероколиты, сопровождающиеся острой дегидратационной диареей, а также эшерихии, продуцирующие шига-токсин и являющиеся возбудителями геморрагического колита (ГК) и гемолитико-уремического синдрома (ГУС). Быстрая и правильная идентификация возбудителей этих двух групп патогенов является важной задачей бактериологов, от решения которой во многом зависит успех лечения пациента, поскольку тактика терапии энтеротоксигенной диареи и ГК с ГУС существенно различается. Высокая способность *Escherichia coli* формировать устойчивые к антимикробным препаратам (АМП) популяции, вплоть до панрезистентных, также является серьёзной проблемой для науки и общественного здравоохранения. Объект исследования – коллекция изолятов *E. coli* (n = 112), выделенных в г. Ярославле в 2015–2017 гг. от 112 детей в возрасте до 5 лет с клиническими проявлениями острой кишечной инфекции, пищевой токсикоинфекции, гемоколита и диареи неясной этиологии. Штаммы *E. coli* первоначально протестированы с помощью диагностических агглютинирующих коли-сывороток, а затем с помощью набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК диареегенных *E. coli* «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL», а также со специфичными олигонуклеотидными праймерами на гены вирулентности и O-серогрупповой принадлежности. На основании полученных данных определена принадлежность изученных штаммов *E. coli* к четырём патогруппам: ЕНЕС (n = 9), ЕРЕС (n = 17), ЕТЕС (n = 1) и ЕАгЕС (n = 1). Все они явились носителями генов патогенности, характерных для каждой патогруппы. Наиболее многочисленная группа ЕРЕС представлена штаммами пяти серогрупп, среди

Для корреспонденции: Карцев Николай Николаевич, науч. сотр. лаб. антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ; e-mail: kartsev@obolensk.org

которых доминирующей являлась серогруппа O26 (9 штаммов). Таким образом, на примере изучения коллекции штаммов диареогенных эшерихий, выделенных в период 2015–2017 гг. в г. Ярославле от детей в возрасте до 5 лет с острыми кишечными инфекциями, показана эффективность применения молекулярно-генетических методов исследований для характеристики *E. coli*: определения у них серогрупп, детекции генов вирулентности и отнесения к патогруппам.

Ключевые слова: диареогенные бактерии *Escherichia coli*; полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ); серогруппы; гены вирулентности.

Для цитирования: Карцев Н.Н., Светоч Э.А., Ершова М.Г., Абросимова Г.Н., Тазина О.И., Пинчук А.С., Фурсова Н.К., Шепелин А.П., Дятлов И.А. Характеристика диареогенных эшерихий, выделенных от детей в возрасте до 5 лет в г. Ярославле. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (4): 249-253. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-249-253>

Kartsev N.N.¹, Svetoch E.A.¹, Ershova M.G.², Abrosimova G.N.², Tazina O.I.¹, Pinchuk A.S.¹, Fursova N.K.¹, Shepelin A.P.¹, Dyatlov I.A.¹

THE CHARACTERISTIC OF DIARRHEAGENIC ESCHERICHIA SEPARATED FROM CHILDREN AGED UNDER 5 YEARS OLD IN YAROSLAVL

¹The Federal Budget Institution of Science "The State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology" of Rosпотребнадзор, 142279, village Obolensk of the Moscow Oblast, Russia

²The State Budget Institution of Health Care "The Yaroslavl oblast infection clinical hospital № 1", Yaroslavl, Russia

The diarrheagenic bacteria coli take a significant place among agents of acute intestinal infections in children aged under 5 years. The main danger among these pathogens is represented by both enterotoxigenic E. coli causing enteritis and enterocolitis accompanied by acute dehydration diarrhea and Escherichia producing shiga-toxin being agents of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. The fast and proper identification of agents of these two groups of pathogens is an important task of bacteriologists to be resolved for successful treatment of patient because tactics of therapy of enterotoxigenic diarrhea and hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome significantly differ. The high capacity of Escherichia coli to form populations resistant to anti-microbial medications, including pan-resistant ones, also is a serious problem for science and public health. The object of study was a collection of isolates of E. coli (n = 112), separated from 112 children aged under 5 years with clinical manifestations of acute intestinal infection, food toxic infection hemocolitis and diarrhea of obscure etiology in Yaroslavl in 2015-2017. Initially, the strains of E. coli were tested using diagnostic agglutinating coli-serums and then using reagents' kit «AmpliSens®Escherichiosis-FL» for detection and differentiation DNA of diarrheagenic bacteria coli and also with specific oligonucleotide primers to genes of virulence and O-serum group belonging. The obtained data permitted to determine belonging of analyzed strains of E. coli to four sub-groups: EHEC (n = 9), EPEC (n = 17), ETEC (n = 1) и EAgEC (n = 1). All of them were agents of genes of pathogenicity specific for every pathogroup. The most numerous group EPEC was represented by strains of five serogroups with dominating among them serogroup O26 (9 strains). Therefore, studying collection of strains of diarrheagenic Escherichia isolated during 2015-2017 in Yaroslavl from children aged under 5 years with acute intestinal infections permitted to demonstrate efficiency of application of molecular genetic methods of analysis for characterizing E. coli i.e. establishment their serogroups, detection of genes of virulence and attributing to pathogroups.

Key words: diarrheagenic *Escherichia coli*; polymerase chain reaction in real-time; serogroups; genes of virulence.

For citation: Kartsev N.N., Svetoch E.A., Ershova M.G., Abrosimova G.N., Tazina O.I., Pinchuk A.S., Fursova N.K., Shepelin A.P., Dyatlov I.A. The characteristic of diarrheagenic *Escherichia* separated from children aged under 5 years old in Yaroslavl. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(4): 249-253. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-249-253>

For correspondence: Kartsev N.N., researcher of the Laboratory of Anti-Microbial Medications of the Department of Molecular Microbiology of the Federal Budget Institution of Science "The State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology", e-mail: kartsev@obolensk.org

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

Acknowledgment. The study was implemented within the framework of the Research № 049 of Rosпотребнадзор "The monitoring and study of characteristics of agents of food and hospital infections, development of means of their diagnostic"

Received 26.11.2017
Accepted 25.12.2017

Введение. *Escherichia coli* является наиболее распространённой факультативно-анаэробной бактерией кишечной микрофлоры теплокровных. Большинство представителей вида, как правило, являются непатогенными для человека и животных, однако отдельные из них, имея определённый набор факторов патогенности, могут причинить серьёзный вред здоровью, вплоть до летального исхода [1]. Патогенные штаммы *E. coli* делятся на две группы: диареогенные *Escherichia coli* (DEC), вызывающие расстройства желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), и *Escherichia coli*, являющиеся причиной внекишечных инфекций у человека и животных (ExPEC), включая сепсис, менингит, инфекцию мочевыводящих путей (ИМП) [2].

Диареогенные *Escherichia coli* – одни из основных этиологических агентов кишечных заболеваний у человека [3]. На основе наличия у DEC специфических факторов вирулентности и фенотипических признаков они подразделяются на семь основных патогрупп: энтеропатогенные *E. coli* (EPEC),

энтеротоксигенные *E. coli* (ETEC), энтероинвазивные *E. coli* (EIEC), продуцирующие шига-токсин *E. coli* (STEC), энтеро-агрегативные *E. coli* (EAgEC), диффузно-адгезивные *E. coli* (DAEC) и адгезивно-инвазивные *E. coli* (AIEC). В свою очередь, патогруппа STEC включает в себя энтерогеморрагические *E. coli* (EHEC) и неэнтерогеморрагические (non-EHEC) [4].

Для детей в возрасте до 5 лет наибольшую опасность среди этих патогенов представляют энтеротоксигенные *E. coli*, вызывающие энтериты и энтероколиты, сопровождающиеся острой дегидратационной диареей, а также продуцирующие шига-токсин эшерихии, являющиеся возбудителями геморрагического колита (ГК) и гемолитико-уремического синдрома (ГУС) [5]. Быстрая и правильная идентификация возбудителей этих двух групп патогенов является важной задачей бактериологов, от решения которой во многом зависит успех лечения пациента, поскольку тактика терапии энтеротоксигенной диареи и ГК с ГУС существенно разли-

чается. До настоящего времени в диагностических лабораториях Российской Федерации основным методом идентификации патогенных эшерихий всё ещё остаётся определение О-серогрупповой принадлежности *E. coli*, а этого с учётом имеющихся молекулярно-генетических методов идентификации явно недостаточно.

Высокая способность *Escherichia coli* формировать устойчивость к антимикробным препаратам (АМП), вплоть до возникновения панрезистентных штаммов, является в настоящее время серьёзной проблемой для науки и здравоохранения всего мира [6]. Появление антибиотикорезистентных штаммов STEC отмечается и в Российской Федерации. В работе отечественных авторов описан случай выделения энтерогеморрагических штаммов *E. coli* серотипа O145:H28, несущих гены шига-токсина *stx2* и интимина *eaeA*, а также ген бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) CTX-M-типа. Продукция БЛРС подтверждена в тесте синергизма с ингибитором бета-лактамаз методом двойных дисков. К препаратам других функциональных классов (не бета-лактамов) данные штаммы были чувствительными [7].

Цели и задачи работы – изучение коллекции изолятов *E. coli*, выделенных в г. Ярославле в 2015–2017 гг. от 112 детей в возрасте до 5 лет; оценка диагностической значимости и достоверности молекулярно-генетических методов для определения серогрупповой принадлежности и принадлежности к патогруппам штаммов *E. coli*; определение доминирующих пато- и серогрупп DEC, выделенных от детей в г. Ярославле.

Материал и методы. Объектом исследования стала коллекция изолятов *E. coli* ($n = 112$), выделенных в г. Ярославле в 2015–2016 гг. от 112 детей в возрасте до 5 лет с клиническими проявлениями острой кишечной инфекции, пищевой токсикоинфекции, гемоколита и диареи неясной этиологии. Культивирование штаммов *E. coli* проводили на плотных питательных средах: питательная среда № 1 ГРМ и лактозный ТТХ агар с тергитолом 7 (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск, Россия). Определение О-серогрупповой принадлежности штаммов *E. coli* осуществляли с помощью реакции агглютинации на стекле с использованием наборов: «Сыворотки диагностические, эшерихиозные ОК сухие для РА-ФСР 42-0010-4610-03», «Сыворотки диагностические, эшерихиозные ОК поливалентные сухие для РА-ФСР 42-0010-4611-03» (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Россия).

Определение чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП) выполняли с помощью бактериологического анализатора VITEK-2 Compact с использованием карты AST-N101 для определения чувствительности энтеробактерий к АМП. В качестве контрольных использовали штаммы *E. coli* ATCC 25922 и *E. coli* ATCC 35218, полученные из коллекции «ГКПМ-Оболенск» (Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур). Интерпретировали результаты согласно критериям European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing – EUCAST 2012–2013 гг. (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) и Клиническим рекомендациям Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия-2015-02» (2015 г.).

Определение патогрупп штаммов *E. coli* осуществляли методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией (ПЦР-РВ) с помощью набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК диареогенных *E. coli* «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). У штаммов с подтверждённой патогруппой гены вирулентности и серогрупп-специфичные гены определяли методом ПЦР-РВ в соответствии с методиками референс-лаборатории Европейского Союза по изучению веротоксин-продуцирующих *E. coli* (European Union Reference Laboratory VTEC): «Идентификация и характеристика

веротоксин-продуцирующих *Escherichia coli* (VTEC) с помощью ПЦР-РВ амплификации основных генов вирулентности и генов серогрупповой принадлежности, ассоциированных с тяжёлыми инфекциями у человека EU-RL VTEC_Method_02_Rev_0», «Обнаружение и идентификация веротоксин-продуцирующих *Escherichia coli* (VTEC) O104:H4 в пищевых продуктах с помощью ПЦР в реальном времени EU-RL VTEC_Method_04_Rev_1», «Обнаружение энтероагрегативных *Escherichia coli* в пищевых продуктах с помощью ПЦР-амплификации в реальном времени генов *aggR* и *aaiC* EU-RL VTEC_Method_05_Rev_1» и «Обнаружение энтеротоксигенных *Escherichia coli* в пищевых продуктах путем ПЦР-амплификации в реальном времени генов *lt*, *stx* и *stp* EU-RL VTEC_Method_08_Rev_0» (<http://www.iss.it/vtec/index.php?lang=2&anno=2017&tipo=3>).

Результаты. Первичная серологическая идентификация культур *E. coli* с помощью диагностических агглютинирующих сывороток показала их принадлежность к 21 серогруппе, среди которых преобладающими были О-группы O144 ($n = 18$), O26 ($n = 16$) и O111 ($n = 12$). На основании принадлежности к серогруппам, в соответствии с инструкцией по применению сывороток, изоляты были предварительно отнесены к соответствующим патогруппам: EPEC ($n = 87$), EIEC ($n = 24$) и EHEC – 1 штамм серогруппы O157.

Все серологически идентифицированные штаммы *E. coli* протестированы нами с помощью набора реагентов для выявления и дифференциации ДНК диареогенных *E. coli* «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL». На основании полученных данных изученные штаммы отнесены к четырём патогруппам: EHEC ($n = 9$), EPEC ($n = 17$), ETEC ($n = 1$) и EAHEC ($n = 1$). Для подтверждения полученных результатов эти штаммы тестировали на наличие у них генов вирулентности: интимина *eae*, шига-токсинов *stx1*, *stx2*, энтерогемолизина *ehxA*, термолabileного энтеротоксина *elt*, термостабильных энтеротоксинов *stx*, *stp* и генетических маркеров энтероагрегативных *E. coli* *aaiC* и *aggR* с помощью ПЦР-РВ со специфичными праймерами и зондами. Кроме того, подтверждали серогрупповую принадлежность DEC-штаммов с помощью ПЦР-РВ

Таблица 1

Генетическая характеристика штаммов DEC, выделенных от детей в г. Ярославле в 2015–2017 гг.

Патогруппа <i>E. coli</i>	О-группа	Гены вирулентности	Количество штаммов
EHEC ($n = 9$)	O26	<i>stx1</i> , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	5
	O111	<i>stx2</i> , <i>eae</i>	1
	O119	<i>stx2</i>	1
	O127	<i>stx2</i> , <i>eae</i>	1
	O157*	<i>stx2</i> , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	1
EPEC ($n = 17$)	O25	<i>eae</i> , <i>ehxA</i>	1
	O26	<i>eae</i>	5
	O26	<i>eae</i> , <i>ehxA</i>	4
	O111	<i>eae</i>	2
	O111	<i>eae</i> , <i>ehxA</i>	1
	O127	<i>eae</i>	3
	O128	<i>eae</i>	1
ETEC ($n = 1$)	O111	<i>elt</i> , <i>stx</i>	1
EAHEC ($n = 1$)	O25	<i>aggR</i>	1

Примечание. * – данный штамм относится к серотипу O157:H7.

Таблица 2

Чувствительность диареогенных *E. coli*, выделенных от детей в г. Ярославле в 2015–2017 гг., к антибактериальным препаратам

Штамм	О- группа	Гены	AMP	AMS	CEF	CEX	CAZ	CTX	FEP	IMI	AMI	GEN	TOB	NAL	CIP	TET	TGC	NIT	CM	CTZ
Штаммы патогруппы ЕРЕС																				
NK1545	O26	<i>eae</i>	> 32	16	4	< 4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	< 2	< 0,25	2	< 0,5	< 16	4	> 32
NK1585	O26	<i>eae</i>	> 32	> 32	4	< 4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	> 32	< 0,25	> 16	< 0,5	< 16	4	> 32
NK291	O26	<i>eae</i>	4	< 2	4	< 4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	< 2	< 0,25	< 1	< 0,5	< 16	< 2	< 20
NK2725	O111	<i>eae</i>	> 32	4	> 64	< 4	8	8	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	> 32	> 4	< 1	< 0,5	< 16	> 32	< 20
NK683	O127	<i>eae</i>	< 2	< 2	4	< 4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	< 2	< 0,25	< 1	< 0,5	< 16	4	< 20
NK1649	O128	<i>eae</i>	8	4	4	< 4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	< 2	< 0,25	< 1	< 0,5	< 16	4	< 20
Штаммы патогруппы ЕНЕС																				
NK437	O26	<i>stx1</i> , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	< 2	< 2	4	< 4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	< 2	< 0,25	< 1	< 0,5	< 16	4	< 20
NK749	O26	<i>stx1</i> , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	4	< 2	4	< 4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	< 2	< 0,25	< 1	< 0,5	< 16	4	< 20
NK215	O26	<i>stx1</i> , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	4	4	4	< 4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	< 2	< 0,25	< 1	< 0,5	< 16	4	< 20
NK1851	O111	<i>stx2</i> , <i>eae</i>	> 32	< 2	2	< 4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	4	< 0,25	2	< 0,5	< 16	> 64	> 32
NK589	O127	<i>stx2</i> , <i>eae</i>	< 2	< 2	4	< 4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	< 2	< 0,25	< 1	< 0,5	< 16	8	< 2
NK1227	O157	<i>stx2</i> , <i>eae</i>	< 2	< 2	4	< 4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	< 1	< 1	< 2	< 0,25	< 1	< 0,5	< 16	4	< 20
Штамм патогруппы EAgEC																				
NK1615	O25	<i>aggR</i>	> 32	> 32	8	8	< 1	< 1	< 1	< 1	< 2	> 16	> 16	> 32	< 0,5	> 16	< 0,5	< 16	> 64	> 320

Примечание. AMP – ампициллин; AMS – амоксициллин-сульбактам; CEF – цефуроксим; CEX – цефокситин; CAZ – цефтазидим; CTX – цефотаксим; FEP – цефепим; IMI – имипенем; AMI – амикацин; GEN – гентамицин; TOB – тобрамицин; NAL – налидиксовая кислота; CIP – ципрофлоксацин; TET – тетрациклин; TGC – тигециклин; NIT – нитрофурантоин; CM – хлорамфеникол; CTZ – котримоксазол.

со специфичными праймерами и зондами на серогруппы O25, O26, O45, O103, O104, O111, O121, O128, O145 и O157. Результаты генетической характеристики изученных штаммов *E. coli* представлены в табл. 1.

По результатам проведенных исследований идентифицированы четыре патогруппы диареогенных эшерихий, несущие характерные для них гены вирулентности. Наиболее многочисленная группа ЕРЕС представлена штаммами пяти серогрупп, среди которых доминирующей являлась серогруппа O26 (9 штаммов). Интересно отметить, что штаммы ЕРЕС серогруппы O26 и O111 разделились на две подгруппы: имеющие ген энтерогемолизина *ehxA* и не имеющие этого гена. Доминирующей серогруппой среди штаммов ЕНЕС также оказалась серогруппа O26 (5 штаммов). Это подтверждает клиническую значимость эшерихий данного серотипа. Тенденция к увеличению эпидемической значимости штаммов ЕНЕС серогруппы O26, по сравнению с классическими представителями ЕНЕС – штаммами серогруппы O157, по данным Европейской референс-лаборатории по изучению *E. coli*, отмечается с начала 2000-х гг. [8].

Особое внимание привлекает факт выделения от трёхмесячного ребёнка энтероагрегативного антибиотикорезистентного штамма *E. coli* серогруппы O25, несущего ген *aggR*, – регулятора оперона синтеза фимбрий, который оказался устойчивым к АМП шести функциональных классов: бета-лактамам, аминогликозидам, хинолонам, тетрациклинам, фениколам и сульфаниламидам, то есть являлся мультирезистентным.

Другим интересным моментом является выделение

штамма ЕТЕС серогруппы O111 с двумя генами энтеротоксигенов *elt* и *sth*, поскольку данная серогруппа наиболее характерна для энтеропатогенных и энтерогеморрагических эшерихий, а энтеротоксигенные штаммы серогруппы O111 выделяли крайне редко.

У 13 штаммов диареогенных *E. coli* с подтверждённой патогруппой определена чувствительность к АМП семи функциональных классов на автоматическом биохимическом анализаторе Vitek-2 Compact. Как следует из табл. 2, из 13 штаммов 4

имели фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ): один штамм ЕРЕС серогруппы O26 был одновременно устойчив к бета-лактамам, налидиксовой кислоте, тетрациклину и сульфаниламидам; другой штамм ЕРЕС серогруппы O111 был одновременно устойчив к бета-лактамам, хинолонам и хлорамфениколу. Один из шести штаммов патогруппы ЕНЕС также обладал фенотипом МЛУ – характеризовался устойчивостью к АМП трёх функциональных классов: ампициллину, хлорамфениколу и ко-тримоксазолу.

Обсуждение. В ходе изучения коллекции диареогенных штаммов *E. coli*, выделенных от детей в возрасте до 5 лет в г. Ярославле, определена их принадлежность к четырём патогруппам, а именно: энтерогеморрагическим, энтеропатогенным, энтеротоксигенным и энтероагрегативным *E. coli*. Наиболее широко представленными среди них были штаммы ЕРЕС и ЕНЕС. Идентифицирован также энтероагрегативный штамм *E. coli* серогруппы O25 с геном *aggR*. Кроме того, выделен и штамм ЕТЕС серогруппы O111 с двумя генами энтеротоксигенов *elt* и *sth*.

Установлено, что два штамма ЕРЕС и один штамм ЕНЕС проявляли фенотип МЛУ – были одновременно устойчивы к АМП трёх и четырёх функциональных классов. Особое внимание обращает на себя энтероагрегативный штамм *E. coli* серогруппы O25, выделенный от ребёнка трёх месяцев, который оказался устойчивым к препаратам шести функциональных классов, то есть был мультирезистентным.

В ходе проведённого исследования среди изученных штаммов ЕРЕС и ЕНЕС установлено доминирование *E. coli* серогруппы O26, что указывает на эпидемиологическую и клиническую значимость эшерихий данной серогруппы. Вследствие этого при выделении *E. coli* данной серогруппы представляется необходимым определение у них факторов патогенности с помощью ПЦР-РВ или иммунохимическими методами, позволяющими напрямую детектировать шига-токсины.

Таким образом, на примере изучения коллекции штаммов диареогенных эшерихий, выделенных в период 2015–2017 гг. в г. Ярославле от детей в возрасте до 5 лет с острыми кишечными инфекциями, показана эффективность применения молекулярно-генетических методов исследований для определения патогрупп, генов вирулентности и серогрупп *E. coli*. Показано значительное биологическое разнообразие диареогенных штаммов *E. coli*, выделенных от детей с клиническими проявлениями диареи, а также необходимость широкого внедрения молекулярно-генетических методов детекции для идентификации патогрупп диареогенных эшерихий.

Наши исследования показывают также, что широко используемое в настоящее время в диагностических лабораториях серологическое типирование DEC-штаммов не позволяет определять их патотип, что в свою очередь может повлечь за собой ошибки в лечении диарей. Особенно это касается ГК, вызванного ЕНЕС, когда применение АБП не рекомендуется: их использование может лишь увеличить число случаев развития ГУС у больных с ГК и осложнить течение болезни.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР № 049 Роспотребнадзора «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1—6, 8 см. REFERENCES)

- Кафтырева, Л.А., Макарова, М.А., Коновалова, Т.А., Матвеева, З.Н., Характеристика энтерогеморрагической *Escherichia coli* O145:H28, выделенной от пациента с гемолитико-уремическим синдромом. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013; 5: 100-4.

REFERENCES

- Belanger L., Garenaux A., Harel J., Boulianne M., Nadeau E., Dozois C.M.. *Escherichia coli* from animal reservoirs as potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011 Jun; 62(1): 1-10.
- Kaper J.B., Nataro J.P., Molby H.L.. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004 Feb; 2(2): 123-40.
- Hodges K., Gill R. Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes*. 2010; 1(1): 4-21.
- Fratamico P.M., DebRoy C., Needleman D.S. Editorial: Emerging Approaches for Typing, Detection, Characterization, and Traceback of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7: 2089.
- Nyholm O., Halkilahti J., Wiklund G., Okeke U., Paulin L., Auvinen P., Siitonen A. Comparative Genomics and Characterization of Hybrid Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Strains. *PLoS ONE*, 2015; 10(8), e0135936.
- French G.L. The continuing crisis in antibiotic resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2010 Nov; 36 Suppl 3: S3-7.
- Kaftyreva L.A., Makarova M.A., Kononova T.A., Matveeva Z.N. Characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H28 isolated from a patient with haemolytic-uremic syndrome. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2013; 5: 100-4. (in Russian)
- Germinario C, Caprioli A, Giordano M, Chironna M, Gallone MS, Tafuri S, Minelli F, Maugliani A, Michelacci V, Santangelo L, Mongelli O, Montagna C, Scavia G, on behalf of all participants of the Outbreak investigation team. Community-wide outbreak of haemolytic uraemic syndrome associated with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O26:H11 in southern Italy, summer 2013. *Euro Surveill*. 2016; 21(38):pii=30343.

Поступила 26.11.17

Принята к печати 25.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.871.1:579.252.551.083.1

Харсеева Г. Г., Щербатая О. С., Лабушкина А. В.

АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE GRAVIS TOX*⁺ В СОСТАВЕ СМЕШАННЫХ БИОПЛЁНОК

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

Цель – определение чувствительности к антибактериальным препаратам штаммов *C. diphtheriae gravis tox*⁺ в составе смешанных биоплёнок. *Объектом исследования* послужили штаммы: *Corynebacterium diphtheriae gravis tox*⁺ № 665, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (полирезистентный), *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (антибиотикочувствительный). *Формировали* две смешанные биоплёнки (120- и 720-часовые) штамма *Corynebacterium diphtheriae gravis tox*⁺ № 665 со штаммами *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (полирезистентный) и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (антибиотикочувствительный). *Чувствительность к антибактериальным препаратам* типовой и биоплёночных культур коринебактерий определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде на основании МПК (мг/л). *Типовая культура* музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox*⁺ № 665, моделирующая смешанные биоплёнки, обладала чувствительностью ко всем использованным антибактериальным препаратам. *При исследовании антибиотикочувствительности* штамма *C. diphtheriae gravis tox*⁺ № 665 в составе биоплёнки со штаммом *C. pseudodiphtheriticum*, полирезистентным к четырём антибактериальным препаратам (цефазолин, канамицин, азитромицин, ципрофлоксацин, МПК

Для корреспонденции: Лабушкина Анна Владимировна, канд. мед. наук, доц. каф. микробиологии и вирусологии № 2; e-mail: galinagh@bk.ru

от $1,25 \pm 0,00$ до $>5 \pm 0,00$ мкг/мл) установлено снижение ($p \leq 0,05$) чувствительности 120-часовой биоплёночной культуры этого штамма к цефазолину, азитромицину, ципрофлоксацину (МПК от 0, 234 $\pm$ 0,11 и до $>5 \pm 0,00$ мкг/мл), 720-часовой - ко всем указанным препаратам (МПК от 0,312 $\pm$ 0,00 до $>5 \pm 0,00$ мкг/мл). При сравнении антибиотикочувствительности биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 установлено, что показатели МПК большинства антибактериальных препаратов и, в особенности тех, к которым полирезистентный, формирующий биоплёнку штамм *C. pseudodiphtheriticum* обладал устойчивостью, выше относительно биоплёночных культур дифтерийных бактерий, выделенных из биоплёнки с антибиотикочувствительным штаммом *C. pseudodiphtheriticum*.

Обнаружена тенденция к снижению антибиотикочувствительности коринебактерий при культивировании в составе смешанных биоплёнок с представителями условно-патогенных коринебактерий, обладающих полирезистентностью к антибактериальным препаратам.

Ключевые слова: *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* № 665; антибиотикочувствительность; смешанные биоплёнки.

Для цитирования: Харсеева Г.Г., Щербатая О.С., Лабушкина А.В. Антибиотикочувствительность *Corynebacterium diphtheriae Gravis tox+* в составе смешанных биоплёнок. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (4): 253-256. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-253-256>

Kharseeva G.G., Scherbataya O.S., Labushkina A.V.

THE ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE GRAVIS TOX+* IN COMPOSITION OF MIXED BIOFILMS

The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Rostov State Medical University" of Minzdrav of Russia, 344022, Rostov-on-Don, Russia

The purpose of study is to determine sensibility of strains of *C. diphtheriae gravis tox+* in the composition of mixed biofilms to antibacterial medications. The object of study was strains of *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* № 665, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (poly-resistant), *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (antibiotic-resistant). Two mixed biofilms (120- and 720-hours) of strain of *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* № 665 with strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (poly-resistant), *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (antibiotic-resistant) were formed. The sensibility of typical and biofilm cultures of *Corynebacteria* to antibiotic medications was established using technique of serial dilution in fluid growth medium on the basis of MPC (mg/l). The typical culture of museum strain *C. diphtheriae gravis tox+* № 665, modeling mixed biofilms had a sensitivity to all used antibacterial medications. The analysis of antibiotic resistance of strain of *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 in content of biofilm with strain *C. pseudodiphtheriticum*, poly-resistant to four antibacterial medications (cefazolin, kanamycin, azithromycin, ciprofloxacin, IPC from 1.25 $\pm$ 0,00 to $>5 \pm 0,00$ mkg/ml) set reduction ($p \leq 0,05$) sensitivity 120-hour biofilm cultures of this strain to cefazolin, azithromycin, ciprofloxacin (MIC of 0, 234 and up to $\pm 0,11 > 5 \pm 0,00$ ug / ml) established decreasing ($p \leq 0,05$) of sensitivity of 120-hours biofilm culture of this strain to cefazolin, azithromycin, ciprofloxacin (MIC from 0, 234 $\pm$ 0,11 to $>5 \pm 0,00$ mkg/ml) and 720-hours culture - to all mentioned medications (MIC from 0,312 $\pm$ 0,00 to $>5 \pm 0,00$ mkg/ml). The comparison of antibiotics resistance of biofilm cultures of strain *C. diphtheriae gravis tox+* № 665 established that indices of MIC of most of antibacterial medications and especially to those that poly-resistant and forming biofilm strain *C. pseudodiphtheriticum* was resistant, were higher as related to biofilm cultures of diphtheritic bacteria separated from biofilm with antibiotic resistant strain *C. pseudodiphtheriticum*. The trend was established related to decreasing of antibiotic sensitivity of *Corynebacteria* at cultivation in content of mixed biofilms with representatives of opportunistic *Corynebacteria* having poly-resistance to antibacterial medications.

Key words: *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* № 665; antibiotic sensitivity; mixed biofilm.

For citation: Kharseeva G.G., Scherbataya O.S., Labushkina A.V. The antibiotic sensitivity of *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* in composition of mixed biofilms. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(4): 253-256. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-4-253-256>

For correspondence: Labushkina A.V., candidate of medical sciences, associate professor of the Chair of Microbiology and Virology № 2 of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Rostov State Medical University", e-mail: galinagh@bk.ru

Information about authors:

Scherbataya O.S. <http://orcid.org/0000-0002-0507-3853>

Kharseeva G.G. <http://orcid.org/0000-0002-6226-2183>

Labushkina A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4490-7013>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 13.12.2017
Accepted 16.01.2018

Введение. Дифтерийная инфекция представляет собой серьёзную проблему здравоохранения, так как циркуляция токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae* в популяции сохраняется за счёт бактерионосительства [5]. Благодаря способности к адгезии и инвазии в макрофаги и клетки фарингеального эпителия, *C. diphtheriae* [2] обеспечивают себе возможность длительно персистировать на слизистой оболочке зева и носа бактерионосителей. В процессе персистенции происходит изменение биологических свойств возбудителя

дифтерии, что может быть связано с формированием биоплёнок [4], в составе которых многие микроорганизмы пребывают в межэпидемический период [8]. Биоплёночные культуры микроорганизмов приобретают устойчивость к факторам иммунитета и антибактериальным препаратам [6].

Развитие антибактериальной терапии в настоящее время достигло значительных успехов, но параллельно с этим существенно увеличился риск развития множественной антибиотикорезистентности микроорганиз-

мов. После окончания курса антибактериальной терапии концентрация антибиотиков во многих тканях становится ниже минимальной подавляющей и определяется как субингибирующая. Такие субингибирующие концентрации антимикробных препаратов не являются бактерицидными, но могут изменить биологические свойства (вирулентность, гидрофобность, адгезивность, инвазивность, токсинопродукция) и сформировать антибиотикостойчивость как возбудителей инфекционного процесса, так и представителей условно-патогенной микрофлоры. Это связано с высокой адаптацией микроорганизмов к условиям окружающей среды, реализуемой, в том числе, и посредством формирования смешанных биоплёнок с представителями нормальной микрофлоры [9]. Микроорганизмы, входящие в состав биоплёнок, способны выживать при воздействии антибактериальных препаратов в таких высоких концентрациях, которые не могут быть достигнуты в организме человека при стандартных терапевтических дозах [11].

Перспективным для лечения больных дифтерией и бактерионосителей является поиск антибактериальных препаратов, препятствующих колонизации дифтерийных бактерий и их размножению, особенно, в составе биоплёнок.

Цель исследования - определение чувствительности к антибактериальным препаратам штаммов *C. diphtheriae gravis tox⁺* в составе смешанных биоплёнок.

Материал и методы. Объектом исследования служили штаммы: *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺* № 665, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ Государственный научно-медицинский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича; *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (полирезистентный) и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (антибиотикочувствительный), выделенные при профилактическом обследовании практически здоровых в бактериологической лаборатории ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Формировали две смешанные биоплёнки: биоплёнка 1 (штаммы *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺* № 665 и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (полирезистентный)) и биоплёнка 2 (*Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺* № 665 и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (антибиотикочувствительный)). Для этого штаммы коринебактерий культивировали на кровяном агаре, затем отбирали колонии и готовили из них микробную взвесь густотой 10^9 по стандарту Мак Фарланда. В равных объёмах (по 0,1 мл) культуры, формирующие биоплёнку 1 и биоплёнку 2, вносили в пробирки с 3 мл сердечно-мозгового бульона с добавлением 20% сыворотки крупного рогатого скота. Через 120 и 720 часов культивирования при $+37^{\circ}\text{C}$ проверяли жизнеспособность выросших биоплёночных культур всех исследованных штаммов коринебактерий [1].

Чувствительность к антибактериальным препаратам (бензилпенициллин, цефазолин, цефотаксим, гентамицин, канамицин, линкомицин, азитромицин, ципрофлоксацин, рифампицин, имипенем, ванкомицин) всех исследованных планктонных и биоплёночных (120- и 720-часовых) культур коринебактерий определяли методом серийных разведений (микрометодом) в жидкой питательной среде [3] по величине минимальной подавляющей концентрации (МПК).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических программ Statistica 6.0 для WindowsXp. Достоверность полученных данных оценивали при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты. Типовая культура музейного штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, моделирующая смешанную биоплёнку, обладала чувствительностью ко всем указанным антибактериальным препаратам, при этом значения МПК колебались в пределах от $0,025 \pm 0,01$ до $0,156 \pm 0,14$ мкг/мл.

При исследовании антибиотикочувствительности штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 в составе биоплёнки 1 (со штаммом *C. pseudodiphtheriticum*, полирезистентным к четырём антибактериальным препаратам (цефазолин, канамицин, азитромицин, ципрофлоксацин), МПК в пределах от $1,25 \pm 0,00$ до $>5 \pm 0,00$ мкг/мл) обнаружены изменения. Установлено снижение ($p \leq 0,05$) чувствительности 120-часовой биоплёночной культуры этого штамма к цефазолину, азитромицину, ципрофлоксацину (МПК в пределах от $0,234 \pm 0,11$ и до $>5 \pm 0,00$ мкг/мл), 720-часовой - ко всем указанным препаратам (МПК от $0,312 \pm 0,00$ до $>5 \pm 0,00$ мкг/мл). При исследовании других антибактериальных препаратов, к которым формировавший биоплёнку полирезистентный штамм *C. pseudodiphtheriticum* обладал чувствительностью [7], выявили снижение ($p \leq 0,05$) чувствительности 120- и 720-часовых биоплёночных культур исследованного токсигенного штамма коринебактерий к цефотаксиму и ванкомицину (МПК от $0,132 \pm 0,00$ до $>5 \pm 0,00$ мкг/мл).

При исследовании антибиотикочувствительности штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 в составе биоплёнки 2 (со штаммом *C. pseudodiphtheriticum*, чувствительным ко всем антибактериальным препаратам), как и при исследовании биоплёнки 1, выявлены изменения. МПК цефазолина, канамицина, ципрофлоксацина в отношении 120-часовой биоплёночной культуры токсигенного штамма коринебактерий превышали ($p \leq 0,05$) аналогичный показатель типовой культуры, как и при исследовании биоплёнки 1. МПК азитромицина при исследовании типовой и 120-часовой биоплёночной культуры этого штамма не отличались. Показатели МПК цефазолина, канамицина, азитромицина, ципрофлоксацина были выше ($p \leq 0,05$) относительно 720-часовой биоплёночной культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, чем типовой культуры этого же штамма. Аналогично показателям МПК биоплёночных культур в составе биоплёнки 1, значения МПК 720-часовой культуры штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 биоплёнки 2 увеличивались как к цефотаксиму, так и ванкомицину, но в меньшей степени. Определение антибиотикочувствительности токсигенного штамма коринебактерий к другим антибактериальным препаратам, взятым в исследование, выявило результаты, аналогичные полученным при изучении биоплёнки 1.

Обсуждение. При сравнении антибиотикочувствительности биоплёночных культур штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 установлено, что показатели МПК большинства антибактериальных препаратов и, в особенности тех, к которым полирезистентный, формирующий биоплёнку 1 штамм *C. pseudodiphtheriticum* обладал устойчивостью, выше относительно биоплёночных культур дифтерийных бактерий, выделенных из биоплёнки 2.

В составе биоплёнок антибиотикочувствительность микроорганизмов существенно снижается [3], что соз-

дает определённые сложности при назначении антибактериальной терапии. Определение чувствительности к антибиотикам возбудителя дифтерии, находящегося в организме при бактерионосительстве в микробном сообществе с представителями нормальной микрофлоры, является актуальным в современных условиях. Учитывая, что представители нормальной микрофлоры могут обладать устойчивостью к антибактериальным препаратам, можно предположить возможную передачу этого свойства токсигенным коринебактериям, попадающим в организм [10]. По нашим данным, антибиотикочувствительность штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665, выделенного из биоплёнки 1, сформированной с полирезистентным штаммом *C. pseudodiphtheriticum*, ниже, чем из биоплёнки 2 с антибиотикочувствительным штаммом *C. pseudodiphtheriticum*. Это может быть связано с передачей генетического материала, кодирующего устойчивость к антибактериальным препаратам (цефазолину, канамицину, азтромамицину, ципрофлоксацину).

Наблюдалось снижение антибиотикочувствительности биоплёночных культур коринебактерий и к антибиотикам, к которым полирезистентный штамм *C. pseudodiphtheriticum* обладал чувствительностью (цефотаксим, ванкомицин). Аналогичные данные получены и при исследовании коринебактерий, выделенных из биоплёнки 2 (с антибиотикочувствительным штаммом *C. pseudodiphtheriticum*). Данный факт может быть связан со свойствами межмикробного матрикса (плотность, толщина, возраст, микробное видообразование, метаболизм), защищающего коринебактерии от воздействия антибактериальных препаратов. При этом механизм действия указанных препаратов (цефотаксим, ванкомицин) обусловлен подавлением синтеза клеточной стенки, а формирующийся межмикробный матрикс биоплёнки экранирует пептидогликан, что ведёт к угнетению доставки антибактериальных препаратов к коринебактериям.

Заключение. Чувствительность штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺* № 665 в составе смешанной биоплёнки 1 (с полирезистентным штаммом *C. pseudodiphtheriticum*) снижалась к цефазолину, азтромамицину, ципрофлоксацину, канамицину, к которым штамм *C. pseudodiphtheriticum* резистентен, в большей степени, чем аналогичный показатель этого же штамма возбудителя дифтерии в составе смешанной биоплёнки 2 (с антибиотикочувствительным штаммом *C. pseudodiphtheriticum*). Обнаружена тенденция к снижению антибиотикочувствительности коринебактерий при культивировании в составе смешанных биоплёнок с представителями условно-патогенных коринебактерий, обладающих полирезистентностью к антибактериальным препаратам.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Окулич В.К. Микробиологические и иммунологические аспекты инфекций, вызванных условно-патогенными бактериями, образующими биоплёнку. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2016; 15 (5): 52-63.

2. Фролова Я. Н., Харсеева Г. Г., Миронов А. Ю. Чувствительность к антибиотикам биоплёночных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 6: 51-3.

3. Харсеева Г. Г., Миронов А. Ю., Фролова Я. Н., Лабушкина А. В. Способность к формированию биопленки возбудителем дифтерии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 2: 36-8.

4. Харсеева Г. Г., Алутина Э. Л., Гасретова Т. Д., Дятлов И. А., Лабушкина А. В., Миронов А. Ю. и др. *ДИФТЕРИЯ: микробиологические и иммунологические аспекты*. М., Практическая медицина; 2014.

5. Bishai W. R., Murray J. R. *Diphtheria and other infections caused by corynebacteria and related species*. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th edn. New York: McGraw-Hill; 2011.

6. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*. 2009; 11 (7): 1034-43.

7. Tianyan Song., Marylise Duperthuy., Sun Nyunt Wai. Sub-Optimal Treatment of Bacterial Biofilms. *Antibiotics*. 2016; 5: 23.

8. Stewart P.S. Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiol. Spectr*. 2015 June ; 3(3): 21.

9. Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J. of Bacteriol*. 2000; 182 (10):2675-9.

10. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 2004.

11. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2015; 4: 291-6.

REFERENCES

1. Okulich V.K. Microbiological and immunological aspects of infections caused by opportunistic bacteria forming biofilm. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo Universiteta*. 2016; 15 (5): 52-63. (in Russian)

2. Frolova Ya.N., Kharseeva G.G., Mironov A.Yu. Sensitivity to antibiotics of biofilm cultures of toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 6: 51-3. (in Russian)

3. Kharseeva G.G., Mironov A.Yu., Frolova Ya.N., Labushkina A.V. Ability to form a biofilm pathogen diphtheria. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 2: 36-8. (in Russian)

4. Kharseeva G.G., Alutina E.L., Gasretova T.D., Dyatlov I.A., Labushkina A.V., Mironov A.Yu. et al. *Diphtheria: microbiological and immunological aspects [Difteriya: mikrobiologicheskie i immunologicheskie aspekty]*. Moscow: *Practicheskaya meditsina*; 2014. (in Russian)

5. Bishai W. R., Murray. J. R. *Diphtheria and other infections caused by corynebacteria and related species*. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 17th edn. New York: McGraw-Hill; 2011.

6. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*. 2009; 11 (7): 1034-43.

7. Tianyan Song, Marylise Duperthuy, Sun Nyunt Wai. Sub-Optimal Treatment of Bacterial Biofilms. *Antibiotics*. 2016; 5: 23.

8. Stewart P.S. Antimicrobial tolerance in biofilms. *Microbiol. Spectr*. 2015 June ; 3(3): 21.

9. Watnick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J. of Bacteriol*. 2000; 182 (10):2675-9.

10. *Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: Methodological guidelines [Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nyim preparatam]*. Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Russian Ministry of Health; 2004. (in Russian)

11. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2015; 4: 291-6.

Поступила 13.12.17

Принята к печати 16.01.18

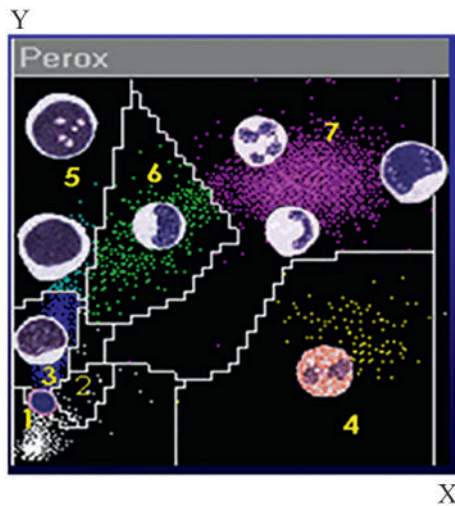


Рис. 1. Скатерограмма распределения лейкоцитов на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/2120i («Siemens») в зависимости от содержания в клетках МПО (ось X) и их размера (ось Y), где цифрами обозначены зоны расположения клеток:

1 – нормобласты, 2–агрегаты тромбоцитов, 3 – лимфоциты + базофилы, 4 – эозинофилы, 5 – большие неокрашенные клетки (LUC), 6 – моноциты, 7 – нейтрофилы.

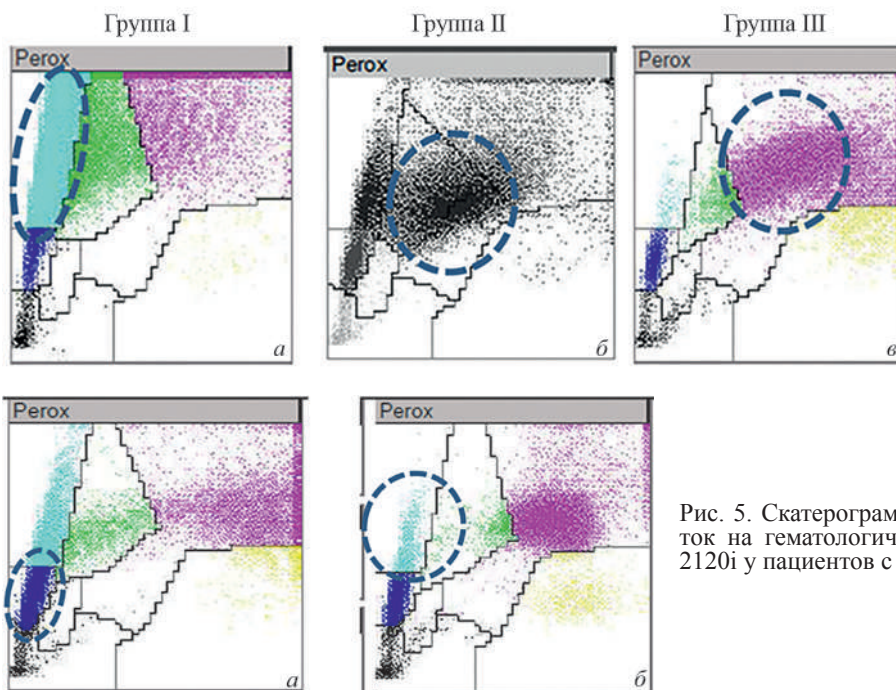


Рис. 4. Скатерограммы распределения бластных клеток на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/ 2120i у пациентов с ОМЛ и ОММЛ из 1-й (а), 2-й (б) и 3-й (в) группы. Здесь и на рис. 5—9: пунктиром обозначены зоны расположения бластных клеток.

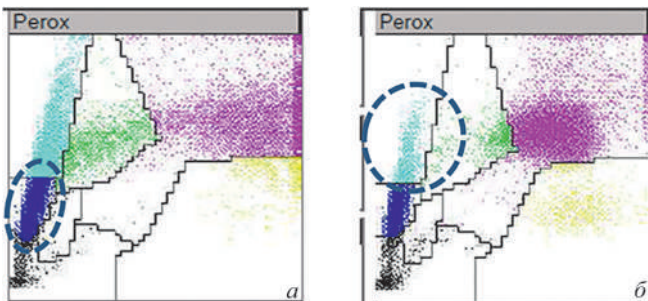


Рис. 5. Скатерограммы распределения бластных клеток на гематологическом анализаторе ADVIA 2120/ 2120i у пациентов с В-ОЛЛ (а) и Т-ОЛЛ (б).

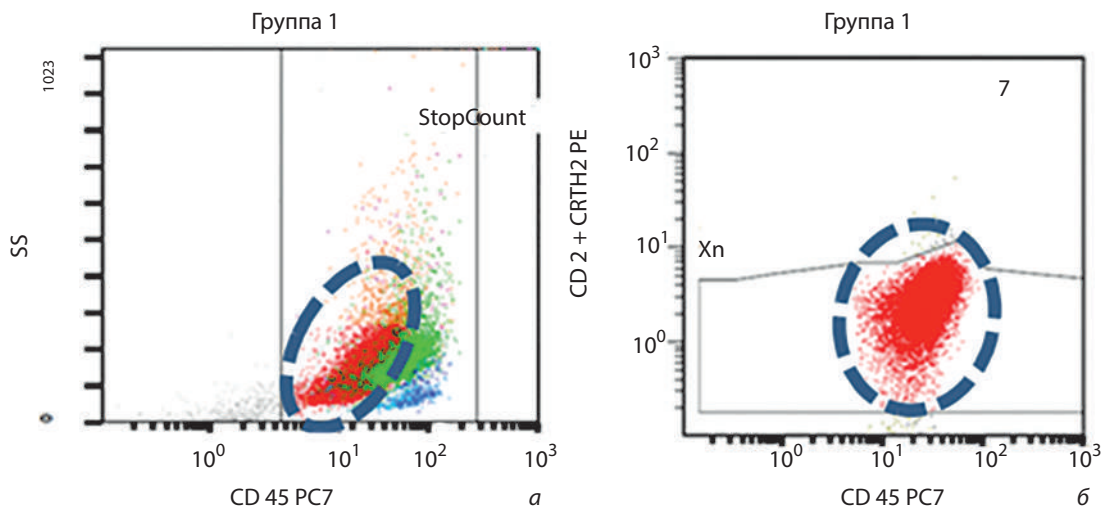


Рис. 6. Скатерограммы распределения бластных клеток периферической крови на проточном цитометре Cytomics FC500 у пациентов с ОМЛ с использованием моноклональных антител против CD45, меченных PC7 и светорассеивания под углом 90° (а); против CD45, меченных PC7 и CD2+CRTH2, меченных PE (б). На скатерограмме б отображены только Xn –бласты.

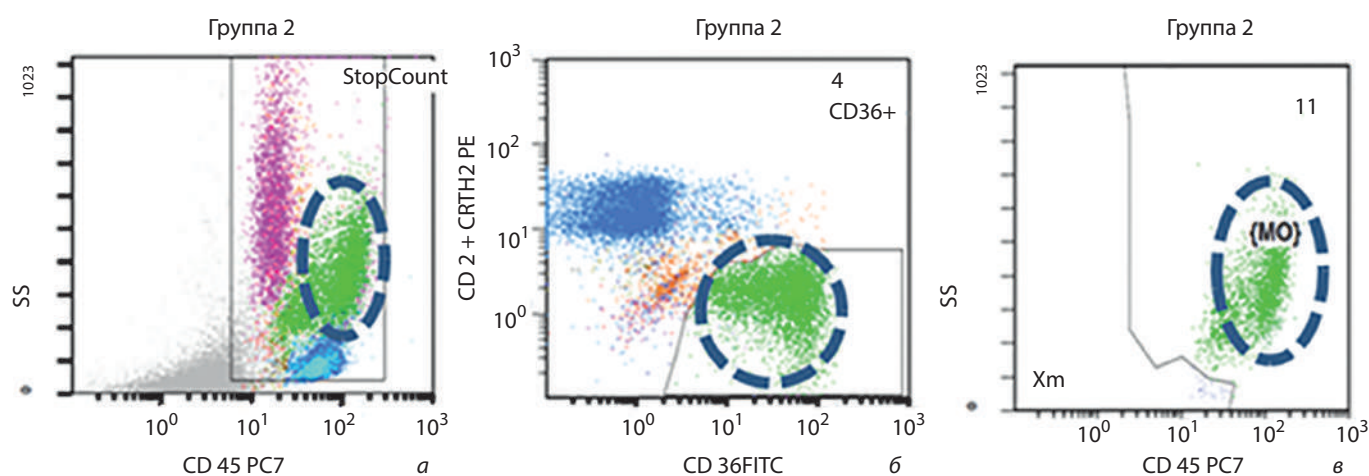


Рис. 7. Скатерограммы распределения бластных клеток периферической крови на проточном цитометре Cytomics FC500 у пациентов с ОММЛ с использованием моноклональных антител против CD45, меченных PC7 и светорассеивания под углом 90° (а, в); против CD36, меченных FITC и CD2+CRTH2, меченных PE (б). На скатерограмме в отображены моноциты и Хм-бласты.

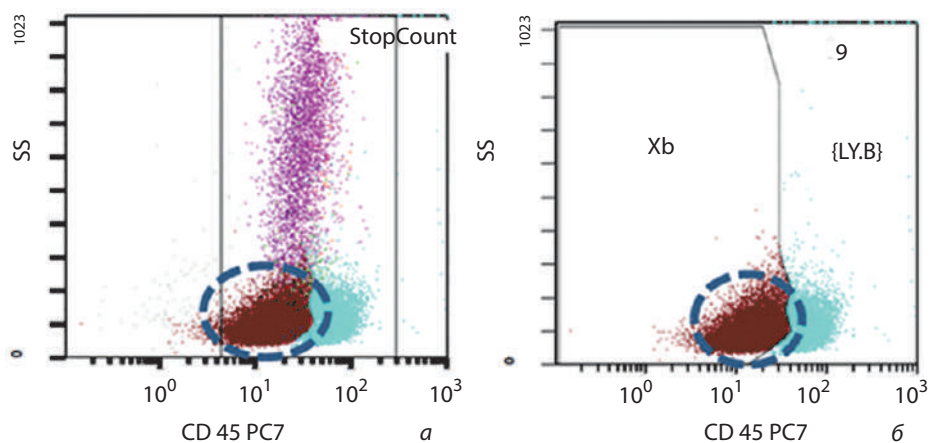


Рис. 8. Скатерограммы распределения бластных клеток периферической крови на проточном цитометре Cytomics FC500 у пациентов с В-ОЛЛ с использованием моноклональных антител против CD45, меченных PC7 и светорассеивания под углом 90° (а, б). На скатерограмме б отображены Xb – бласты и В-лимфоциты.

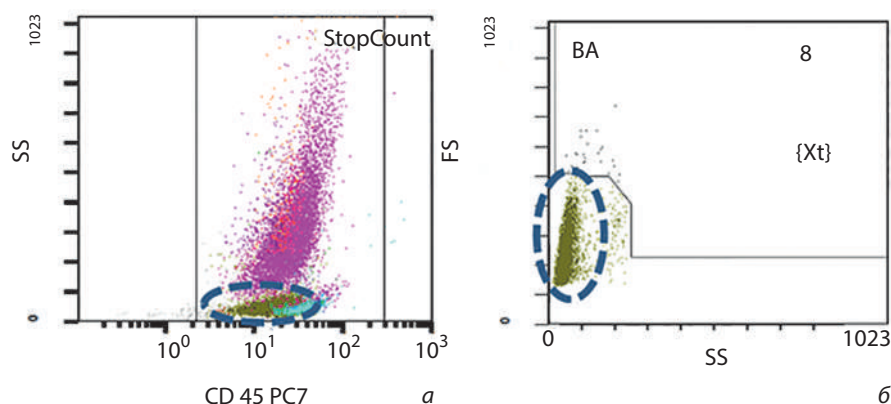


Рис. 9. Скатерограммы распределения бластных клеток периферической крови на проточном цитометре Cytomics FC500 у пациентов с Т-ОЛЛ с использованием моноклональных антител против CD45, меченных PC7 и светорассеивания под углом 90° (а); светорассеивания под углом 90° и 0° (б). На скатерограмме б отображены только Xt – бласты.