

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 64

3 • 2019

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

МАРТ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

Телефон редакции:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л. А. Шанкина

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. 8-903-724-40-29

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

Художественный редактор

Е.М. Архипова

Сдано в набор 27.03.2019.

Подписано в печать 30.04.2019.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

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

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.wakc.ru,

www.pressa-rt.ru

**Подписка на электронную версию:
elibrary.ru**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2019. № 3. 129–192.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. Н. ТИТОВ

А. Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В. В. ДОЛГОВ, Г. Н. ЗУБРИХИНА, А. А. ИВАНОВ, С. А. ЛУГОВСКАЯ, А. Ю. МИРОНОВ (зам. главного редактора), В. Т. МОРОЗОВА, Л. М. ПИМЕНОВА (ответственный секретарь), Л. М. СКУИНЬ, А. А. ТОТОЛЯН, И. П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 64
3 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

MARCH

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*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief V. N. TITOV

A. B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRICHINA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, A.Yu. MIRONOV (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*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOVA (*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-Peterburg*), G.A. YAROVAYA (*Moscow*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н., Сажина Н.Н., Евтеева Н.М.* Озон окисляет олеиновую жирную кислоту с наиболее высокой константой скорости реакции, пальмитиновую же не окисляет вообще. Различия физико-химических параметров субстратов и роль в филогенезе. 132
- Ковязина Н. А., Алхутова Н.А.* Индекс ДГЭАС/кортизол как маркер стресс-индуцированного преждевременного старения 140
- Ивануса С.Я., Иванов А.М., Лазуткин М.В., Чеботарь А.В.* Перспективные возможности современной лабораторной диагностики инфекционных осложнений острого панкреатита (обзор литературы) 145
- Затевалов А.М., Гудова Н.В., Оганесян А.С., Селькова Е.П., Миронов А.Ю., Гречишникова О.Г.* Референсные значения короткоцепочечных жирных кислот в слюне у пациентов ОРИТ без респираторной патологии. 153

ИММУНОЛОГИЯ

- Амелина Е.А., Арсеньева В.А., Марданлы С.С., Марданлы С.Г.* Применение непрямого метода иммуноферментного анализа для выявления специфических IgM к вирусу герпеса человека 6 типа 158

КОАГУЛОЛОГИЯ

- Халиулин А.В., Гусякова О.А., Козлов А.В., Габрильчак А.И.* Процессы метаболизма и механизмы регуляции активности тромбоцитов (обзор литературы) 164
- Гусякова О.А., Гильмиярова Ф.Н., Кузьмичева В.И., Ерещенко А.А., Потякина Е.Е., Мурский С.И., Бородина И.А., Васильева Т.В., Гильмиаров Э.М., Магсумова О.А., Халиулин А.В., Арчибасова О.В.* Особенности показателей коагулограммы в зависимости от антигенного состава группы крови по системе АВ0. 170

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Дьяконов Д.А., Росин В.А., Федоровская Н.С.* Расхождения результатов автоматизированного анализа и микроскопического исследования крови (примеры клинических случаев) 176
- Прохвятилова Е.В., Тетерятникова Н.Н., Захарова И.Б., Белицкая Л.И., Викторов Д.В., Топорков А.В.* Проведение этапов государственной регистрации набора реагентов для обнаружения и дифференциации ДНК буркгольдерий группы «Pseudomallei» 180
- Самойлова М.В., Косырева Т.Ф., Анурова А.Е., Абрамович Р.А., Миронов А.Ю., Жиленкова О.Г., Затевалов А.М., Воропаяева Е.А.* Оценка микробиоценоза полости рта на основе ГХ-МС-определения плазмалогена и бактериального эндотоксина в ротовой жидкости. 186

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N., Sazhina N.N., Evteeva N.M.* Ozone oxidizes oleic fatty acid with the highest rate constant and does not oxidize palmitic acid. different physicochemical parameters of substrates and their role in phylogenesis 132
- Kovyazina N.A., Alhutova N.A.* DGEAS / cortisol index as a marker of stress-induced premature aging 140
- Ivanusa S.Ya., Ivanov A.M., Lazutkin M.V., Chebotar A.V.* Opportunities of modern laboratory diagnostics of infectious complications of acute pancreatitis (literature review) 145
- Zatevalov A.M., Gudova N.V., Oganesyanyan A.S., Selkova E.P., Mironov A.Yu., Grechishnikova O.G.* Reference values of short-cellular fatty acids in saliva in intensive care unit patients without respiratory pathology 153

IMMUNOLOGY

- Amelina E.A., Arsenyeva V.A., Mardanly S.S., Mardanly S.G.* Application of the indirect method of the enzyme immunoassay for the identification of specific IgM to human herpes virus 6 type 158

COAGULOGY

- Khaliulin A.V., Gusyakova O.A., Kozlov A.V., Gabrilchak A.I.* Metabolism processes and mechanisms of regulation of platelet activity (review of literature) 164
- Gusyakova O.A., Gilmiyarova F.N., Kuzmicheva V.I., Ereshchenko A.A., Potyakina E.E., Murskiy S.I., Borodina I.A., Vasileva T.V., Gilmiyarov E.M., Magsumova O.A., Khaliulin A.V., Archibasova O.V.* Coagulation test features depending on the AB0-blood groups system antigenic composition 170

MICROBIOLOGY

- Diakonov D.A., Rosin V.A., Fedorovskaya N.S.* Distinctions of the results of automated analysis and microscopic blood investigation (examples of clinical cases) 176
- Prokhvatilova E.V., Teteryatnikova N.N., Zakharova I.B., Belitskaya L.I., Viktorov D.V., Toporkov A.V.* Preparation for state registration of the reagent kit for the detection and differentiation of the DNA of burkholderia «Pseudomallei» group 180
- Samoylova M.V., Kosyрева T.F., Anurova A.E., Abramovich R.A., Mironov A.Yu., Zhilenkova O.G., Zatevalov A.M., Voropayeva E.A.* Oral cavity microbiocenosis assessment on the basis of bacterial endotoxin and plasmalogens in a saliva by method GAS-liquid chromatography-mass spectrometry 186

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Титов В.Н.¹, Сажина Н.Н.², Евтеева Н.М.²

ОЗОН ОКИСЛЯЕТ ОЛЕИНОВУЮ ЖИРНУЮ КИСЛОТУ С НАИБОЛЕЕ ВЫСОКОЙ КОНСТАНТОЙ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ, ПАЛЬМИТИНОВУЮ ЖЕ НЕ ОКИСЛЯЕТ ВООБЩЕ. РАЗЛИЧИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СУБСТРАТОВ И РОЛЬ В ФИЛОГЕНЕЗЕ

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

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, Россия

Физико-химическое различие параметров окисления O₃ пальмитиновой и олеиновой ЖК в филогенезе (эволюции) явилось одним из основополагающих факторов становления последовательно: а) реакций синтеза пальмитолеиновой МЖК; б) формирования карнитин пальмитоил ацилтрансферазы как транспортера ЖК в митохондрии и, наконец, в) синтеза in vivo олеиновой НЖК при гуморальном, регуляторном действии инсулина. В стремлении к более высоким кинетическим параметрам организмов, невозможно изменить физико-химические и биохимические реакции в матриксе митохондрий, но можно обеспечивать митохондрии субстратом, который даст органеллам возможность выразить увеличенную эффективность и количество нарабатываемого ими АТФ. Физико-химические параметры олеиновой МЖК явились эталонным субстратом окисления при наработке in vivo энергии, синтезировать которую организмы стремились в филогенезе миллионы лет. Вторым основополагающим фактором становления кинетического совершенствования организмов в филогенезе явилось воздействие факторов внешней среды. Бывают ли они благоприятными, чаще нет, но они формируют условия, которые во многом стимулируют все приспособительные (адаптивные) функции организма, в том числе биологическую функцию локомоции, когнитивную функцию - функцию позиционирования вида (особи) в окружающей среде и в столь разнообразном мире. И сформированное биологическое, энергетическое, кинетическое совершенство in vivo можно столь легко нарушить, если травоядный в филогенезе Homo sapiens начинает злоупотреблять плотоядной мясной пищей; ее на ступенях филогенеза ни предки человека, ни сам человек никогда не употреблял. Это и есть основная причина столь частого распространения в популяции метаболических пандемий как синдром резистентности к инсулину, атеросклероз и атероматоз, ожирение и неалкогольная жировая болезнь печени. И самые эффективные методы профилактики метаболических пандемий, ИБС и инфаркта миокарда до наивности просты. Человек всегда должен оставаться травоядным.

Ключевые слова: пальмитиновая; олеиновая жирные кислоты, филогенез; инсулин; Homo sapiens – травоядный.

Для цитирования: Титов В.Н., Сажина Н.Н., Евтеева Н.М. Озон окисляет олеиновую жирную кислоту с наиболее высокой константой скорости реакции, пальмитиновую же не окисляет вообще. Различия физико-химических параметров субстратов и роль в филогенезе. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64(3): 132-139.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-132-139>

Titov V.N.¹, Sazhina N.N.², Evteeva N.M.²

ОЗОН ОКИСЛЯЕТ ОЛЕИЧЕСКУЮ ЖИРНУЮ КИСЛОТУ С НАИБОЛЕЕ ВЫСОКОЙ КОНСТАНТОЙ СКОРОСТИ РЕАКЦИИ, ПАЛЬМИТИНОВУЮ ЖЕ НЕ ОКИСЛЯЕТ ВООБЩЕ. РАЗЛИЧИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ СУБСТРАТОВ И ИХ РОЛЬ В ФИЛОГЕНЕЗЕ

¹National Medical Research Center for Cardiology Ministry of Health, 121552, Moscow, Russia;

²Emanuel Institute of Biochemical Physics, 119334, Moscow, Russia

Physicochemical differences between O₃ oxidation parameters for palmitic and oleic fatty acids (FA) during phylogenesis (evolution) are fundamental for a) production of palmitoleic monounsaturated fatty (MFA), b) formation of carnitine palmitoyltransferase as a FA transporter to mitochondria, and c) in vivo production of oleic MFA under humoral regulatory effect of insulin. In the strive for the best kinetic parameters of biological organisms without a possibility of modifying physicochemical and biochemical reactions in the mitochondrial matrix, the mitochondria can be provided with a substrate that increases energy production efficiency and the amount of ATP. Physicochemical parameters of oleic MFA has become the standard of an oxidation substrate for in vivo energy production; this MFA was synthesized in organisms for millions of years. Environmental influences are the second factor which determines kinetic perfection of biological organisms during phylogenesis. Are these influences always beneficial? Mostly, they are not. However, they largely stimulate adaptive functions of the organism, including the biological function of locomotion, cognitive function and the function of positioning in the environment. Biological, energy and kinetic perfection formed in vivo can be easily destroyed if phylogenetically herbivorous Homo sapiens abuses the diet of carnivorous animals (meat) which was not consumed by him and his ancestors during phylogenesis. This abuse is the major cause of metabolic pandemics in human

population. They are: insulin resistance, atherosclerosis and atheromatosis, obesity and nonalcoholic liver disease. The most effective measures preventing metabolic pandemics, cardiac heart disease and myocardial infarction are extremely simple. People should remain herbivorous.

Key words: palmitic and oleic fatty acids; phylogenesis; insulin; carnivores and herbivores.

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

For citation: Titov V.N., Sazhina N.N., Evteeva N.M. Ozone oxidizes oleic fatty acid with the highest rate constant and does not oxidize palmitic acid. Different physicochemical parameters of substrates and their role in phylogenesis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (3): 132-139. (in Russ.) DOI : <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2-84-2019-64-3-132-139>

Acknowledgment. This study had no sponsorship.

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

Received 25.02.2019
Accepted 01.03.2019

В 2004 г. опубликована статья «Кинетические параметры окисления озонном индивидуальных жирных кислот». В ней автоматическое титрование O_3 индивидуальных жирных кислот (ЖК) *in vitro* на анализаторе двойных связей (АДС) показало, что окисление ω -9 C18:1 *cis* олеиновой мононенасыщенной ЖК (МЖК) происходит с константой скорости реакции существенно выше, чем C16:0 пальмитиновой насыщенной ЖК (НЖК) [1]. Первые эксперименты проведены на опытном образце АДС при окислении озонном стилибена (стандартный образец), пальмитиновой и олеиновой ЖК, α -токоферола и β -каротина. Через 12 лет эксперименты повторены на серийном образце АДС; окислены 13 индивидуальных ЖК [2]. И хотя абсолютные значения констант скорости реакций окисления O_3 в двух сериях опытов отличались, зависимость осталась той же.

Реально оценивая функциональное предназначение ЖК как субстратов *in vivo*, мы, в зависимости от содержания в цепи атомов углерода двойных связей (ДС), подразделяем ЖК на:

- а) НЖК – ДС не имеют;
 - б) МЖК – имеют в цепи атомов С одну ДС;
 - в) ненасыщенные ЖК (ННЖК) с 2-3 ДС в цепи и
 - г) полиеновые ЖК (ПНЖК) с 4-6 ДС в молекуле
- длинноцепочечных ЖК. Химики же подразделяют ЖК проще на НЖК, МЖК и ПНЖК. В функциональном же отношении *in vivo* ни ω -6 C18:2 линолевая, ни ω -6 C18:3 γ -линоленовая и ω -3 C18:3 α -линоленовая ННЖК функционально являются разными. Клетки не используют ННЖК в синтезе аминокислот в структуре внутреннего монослоя бислоистой плазматической мембраны клеток, тем более для синтеза ранних в филогенезе биологически активных эйкозаноидов. И если клетки при блокаде поглощения ими ПНЖК, компенсаторно начинают синтез эйкозаноидов не из физиологичных ПНЖК, а из афизиологичных ННЖК, в частности, из ω -9 C20:3 дигомо- γ -линоленовой ННЖК, все гуморальные медиаторы – эйкозаноиды лишены функциональной активности [3].

Константы скорости реакции окисления озонном индивидуальных ЖК. Реакция, параметры которой мы обсуждаем, это озонлиз – «фиксация» молекулы O_3 на ДС в цепи атомов углерода с последующим ее разрывом и образованием озонидов; химически они неу-

стойчивы и быстро разлагаются. Физико-химическая реакция озонлиза происходит очень быстро; константа скорости реакции составляет порядка 10^5 - 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ [4]. Далее следует каскад реакций и преобразование свободного радикала во вторичный озонид. Далее происходит образование промежуточных радикалов, которые превращаются в спирты, альдегиды и карбонильные кислоты [5]. *In vivo* озонлиз наиболее активно модифицирует фосфолипиды (ФЛ) мембран клеток. Озон реагирует с ДС в цепи ЖК, когда в аминокислотах в sn-2 позиции глицеридов этерифицированы ПНЖК. Характерными продуктами модификации липидов являются диеновые конъюгаты и малоновый диальдегид; по концентрации их оценивают активность озонлиза ЖК в липидах. Липидами, мы полагаем, являются все ЖК и все соединения, в состав которых ЖК входят.

Анализатор двойных связей, модели АДС-4М использован нами для измерения количества ДС в органических соединениях. Принцип действия анализаторов основан на способности непредельных органических соединений быстро и количественно присоединять озон по месту расположения ДС (одна молекула O_3 на одну ДС). Поскольку скорость взаимодействия озона с ДС в ЖК на несколько порядков выше скорости взаимодействия с иными функциональными группами, это обеспечивает высокую селективность анализа. При барботировании O_3 -кислородной смеси через исследуемый раствор, концентрация озона на выходе из реакционного сосуда уменьшается. Это изменение АДС преобразует в электрический сигнал и далее регистрирует в виде динамичной кривой поглощения озона. Площадь ограниченной этой кривой пропорциональна количеству прореагировавшего O_3 и соответствует количеству ДС в анализируемой ЖК. Данные полученные нами ранее [6], приведены в таблице.

Основными физико-химическими параметрами ЖК, которые могут определять кинетику их взаимодействия с озонном, являются:

- а) число атомов С в алифатической цепи, ее длина;
- б) число ДС в цепи ЖК;
- в) локализация ДС по длине цепи атомов С и
- г) конфигурация ДС (*cis* ли *rans*).

Самое большое значение константы ($k_{ЖК} = 2,58 \cdot 10^5$

Измеренное число ДС в индивидуальных ЖК и константы скорости реакций взаимодействия их с озоном

| № образца | Наименование ЖК | Измеренное число ДС | $k_{\text{жк}} \cdot 10^5, (\text{M} \cdot \text{c})^{-1}$ |
|-----------|---|---------------------|--|
| 1 | Олеиновая (C 18:1, <i>cis</i> 9) | 0,996±0,024 | 2,58±0,33 |
| 2 | Элаидиновая (C18:1, <i>trans</i> 9) | 0,994±0,021 | 1,40±0,23 |
| 3 | Петроселиновая (C18:1, <i>cis</i> 6) | 1,012±0,013 | 1,53±0,21 |
| 4 | Вакценовая (C18:1, <i>cis</i> 11) | 1,038±0,067 | 1,32±0,26 |
| 5 | Пальмитолеиновая (C16:1, <i>cis</i> 9) | 0,998±0,026 | 1,30±0,13 |
| 6 | Гадолеиновая (C20:1, <i>cis</i> 11) | не раствор. | - |
| 7 | Эруковая (C22:1, <i>cis</i> 13) | 0,998±0,023 | 1,03±0,08 |
| 8 | Нервоновая (C24:1, <i>cis</i> 15) | 1,011±0,021 | 0,99±0,02 |
| 9 | Линолевая (C18:2, <i>cis</i> 9,12) | 1,984±0,031 | 1,47±0,22 |
| 10 | Линоленовая (C18:3, <i>cis</i> 9,12,15) | 3,002±0,015 | 0,93±0,11 |
| 11 | Арахидоновая (C20:4, <i>cis</i> 5,8,11,14) | 3,976±0,031 | 0,85±0,13 |
| 12 | Докозагексаеновая (C22:6, <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19) | 6,012±0,032 | 0,56±0,03 |
| 12 | Миристиновая (C14:0) | 0 | 0 |
| 13 | Пальмитиновая (C16:0) | 0 | 0 |

* Исходная концентрация всех растворов $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$, вводимых в реактор объемом 10–40 мкл.

($\text{M} \cdot \text{c}^{-1}$) выявлено для ω -9 C18:1 *cis* олеиновой МЖК; ДС в ней расположена в центре цепи в *cis* конфигурации. Конформация этой связи, т.е. изменение конфигурации на *trans*, уменьшает скорость взаимодействия элаидиновой ЖК с озоном почти в 2 раза. Объяснить это можно тем, что потенциальная энергия *trans* изомера меньше, чем у *cis* изомера. Поэтому реакция с озоном проходит с большей энергией активации, т.е. меньшая доля молекул *trans* изомера обладает достаточной энергией для преодоления барьера активации.

Элаидиновая ω -9 C18:1 *trans* ЖК имеет иные химические и физические свойства из-за иной конфигурации ДС: более высокую температуру плавления (45°C) по сравнению с *cis* леиновой кислотой ($13,4^\circ\text{C}$). Происходит это по причине способности *trans* молекул ЖК уплотняться более тесно, формируя почти «твердое тело»; они охраняют более плотную упаковку и при температуре организма. Расположение ДС по длине цепи для ЖК (C:18) также меняет величину константы скорости взаимодействия с озоном, как видно из таблицы для олеиновой (C18:1, *cis* 9), петроселиновой (C18:1, *cis* 6) и вакценовой (C18:1, *cis* 11) ЖК. Более латеральное расположение ДС в *cis* конфигурации (ближе к метильному или карбоксильному концу цепи ЖК) уменьшает константу скорости реакции окисления.

Для МЖК с разной длиной алифатической цепи (пальмитолеиновой, эруковой и нервоновой) отмечено уменьшение константы скорости окисления с увеличением числа атомов С в молекуле. С увеличением числа ДС в молекуле ННЖК и особенно ПНЖК, скорость реакции окисления их озоном уменьшается; процесс идет более медленно. Возможно, O_3 последовательно разрывает ДС в зависимости от их расположения и энергии связи. Для докозагексаеновой ЖК (C22:6, *cis* 4,7,10,13,16,19) константа скорости составила всего-то $0,56 \cdot 10^5, (\text{M} \cdot \text{c})^{-1}$; что примерно в 5 раз меньше, чем для олеиновой ЖК (C 18:1, *cis* 9). В то же время, в экспериментах *in vitro* озон не окисляет НЖК, ни C14:0 миристиновую, ни C16:0 пальмити-

новую НЖК, ни C18:0 стеариновую НЖК, что приведено в литературе.

Физико-химические параметры определяют наиболее высокую скорость окисления *in vitro* олеиновой МЖК. Энергия химической связи равна работе, которую необходимо затратить, чтобы разделить молекулу на две части (на атомы, группы атомов) и удалить их друг от друга на бесконечное расстояние [7]. Зависимо от радикалов, которые образуют химическую связь (ковалентная, водородная связь), от кратности связи (ДС, тройная связь) энергия связи имеет величину от 8-10 до 1000 килоджоулей, кДж/моль. Энергия химической связи определяет реакционную способность вещества; ее используют и при расчете кинетики химических реакций [8].

В составе НЖК энергия разрыва связи между атомами углерода в цепи составляет около 381 кДж/моль, у МЖК по месту единственной ДС она равна ≈ 364 кДж, т.е. существенно меньше. Активные формы O_2 могут отнимать атом водорода из группы CH_2 в составе МЖК и ННЖК и превращать их в свободнорадикальные группы CH^* . Радикал ЖК легко присоединяет молекулу O_2 и превращается в перекисный радикал ЖК. Перекиси являются нестабильными; они распадаются с образованием альдегидов в результате разрыва в цепи ЖК связи С-С, которая соседствует с перекисной группой. Подобным образом происходит окисление НЖК и ННЖК. И МЖК; ННЖК и НЖК в большей мере подвержены β -окислению, чем α - или ω -окислению [9].

Положение и число ДС в ЖК определяет особенности их окисления. При окислении олеиновой МЖК *in vivo* энергии выделяется больше и в течение более короткого интервала времени, чем при окислении пальмитиновой НЖК. В цепи атомов углерода в ЖК энергия разрыва связи между крайними атомами С (с метильного и карбоксильного концов) является наиболее высокой; она уменьшается по мере увеличения числа атомов углерода в цепи [10]. В ЖК энергия разрыва связи между атомами в цепи атомов С постепенно уменьшается по направлению к середине цепи. В

C8:0 ЖК она составляет: 394 – 373 – 364 – 360 – 360 – 364 – 373 – 394 кДж/моль [11].

Как особенности структуры, так и масса молекулы ЖК (углеводородов) оказывают влияние на величину энергии разрыва связей между атомами С, углерода с водородом и углерода с серой. Данные получены авторами в процессе выяснения корреляции между структурными и термодинамическими характеристиками, учитывая различия в типах связи и тепловом характере химических реакций. Предложено также уравнение расчета энергетического и водного баланса катаболизма ЖК и ТГ, коэффициента их сравнительной биоэнергетики [12]. Предложено также эмпирическое уравнение для вычисления энергии диссоциации СН-С и С-С связей в молекулах насыщенных углеводородов и свободных алифатических радикалов [13].

Обращает на себя внимание выраженное различие константы скорости окисления озоном ω -9 C18:1, *cis* олеиновой МЖК и ω -9 C16:1, *cis* пальмитолеиновой МЖК. Обладая выраженным сходством физико-химических параметров, две МЖК различаются только по длине цепи ЖК. В олеиновой МЖК двойная связь расположена между девятым и десятым атомом углерода, считая от метильного конца молекулы; ДС равно удалена как от метильного, так и от карбоксильного конца ЖК. В ω -9 пальмитолеиновой МЖК, единственная ДС смещена к карбоксильному концу цепи ЖК. И этого различия структуры оказывается достаточно, чтобы свойства ее как субстрата для окисления озоном *in vitro* оказались в два раза менее предпочтительными. Подобно пальмитолеиновой МЖК, более низкие константы скорости окисления озоном характерны и для более длинноцепочечных МЖК, как эруковая и нервоновая (см.таблицу).

Окисление индивидуальных ЖК in vitro и in vivo. Важно отдавать себе отчет в том, что все физико-химические закономерности, которые мы выявили в экспериментах *in vitro*, в полной мере остаются такими же и в биохимических реакциях метаболизма *in vivo*. И в митохондриях *in vivo*, физико-химические параметры олеиновой МЖК определяют наиболее высокую константу скорости ее окисление в физико-химических и биохимических реакциях матрикса. Окисление только олеиновой МЖК обеспечивает наиболее высокую эффективность функции митохондрий, наработку ранними в филогенезе органеллами большого количества энергии в форме макроэргического аденозинтрифосфата (АТФ) в единицу времени. И если в экспериментах *in vitro* озон в равной мере не окисляет пальмитиновую и миристиновую НЖК, то *in vivo* митохондрии активно окисляют C14:0 миристиновую, среднецепочечную НЖК но, как и *in vitro*, с нежеланием, с низкой константой скорости реакции, окисляют и длинноцепочечную пальмитиновую C16:0 НЖК [14, 15].

И если на ступенях филогенеза, при формировании на суше новых видов животных с более высокими параметрами кинетических реакций, при становлении новой биологической функции – функции локомоции, можно обоснованно полагать, что субстратом для окисления в митохондриях будет олеи-

новая МЖК. Роль биологии на ступенях филогенеза состоит, в формировании последовательности включения биологических реакций, в системном подходе, в построении единого для всех животных филогенеза, единого для всего живого анамнеза. Происходило это (происходит и сей час) в условиях воздействия чаще неблагоприятных факторов внешней среды. В то же время, отдельные этапы становления биологических процессов в филогенезе обоснованно рассматривать с позиций физической химии, биохимии и даже математики. Науку, мы представляем себе как, по сути, как единение когнитивной биологической функции, интеллекта, профессионального совершенства и философии, как науке наук.

В стремлении рассмотреть все закономерности общей биологии с единых позиций, можно проследить физические и физико-химические начала в становлении филогенеза всего живого, в эволюции, в основных критериях естественного отбора, а также и в системах молекул полимеров. При этом критериями отбора являются физические и физико-химические свойства макромолекул и их комплексов. Как критерии реальности теории можно рассматривать и возможность дедуктивного ее построения на основе объективной реальности, данной нам в ощущениях в физике и химии. Биология – наука историческая. При этом важно рассмотреть не только порядок построения биологических функций на ступенях филогенеза, но и условия формирования кинетических параметров биологического совершенства организмов на ступенях филогенеза. Основной чертой процесса биологической эволюции является основополагающая роль, доминирование кинетических закономерностей [16].

Направленность биологической эволюции определена в первую очередь физико-химическими факторами, далее биологическими функциями и биологическими реакциями. Совершенствование живых организмов на ступенях филогенеза всегда направлено в сторону большего кинетического (биологического) совершенства, формирования биологической функции локомоции – движения за счет сокращения поперечнополосатых скелетных миоцитов. В условиях естественного, конкурентного отбора всегда побеждают виды животных, кинетические параметры функции локомоции которых являются более совершенными. Это относится: а) к погоне при желании добыть пищу; б) при убегании в стремлении этой пищей не стать; в) при сезонных миграциях с целью поиска пищи и г) длительных перелетах птиц, перехода рыб из соленой воды океана в пресную воду рек в стремлении сохранить вид, для реализации биологической функции размножения, сохранения вида [17].

Кинетические параметры организма максимальны при окислении

в митохондриях олеиновой МЖК. Согласно приведенным нами выше данным (см.таблицу), с наиболее высокой константой скорости реакции как в опытах *in vitro*, как и в экспериментах с животными *in vivo*, клетки окисляют олеиновую МЖК. Исходя из этого, можно понять стремление клеток на ступенях филогенеза сформировать такие биохимические и физико-

химические реакции, при которых митохондрии могли бы всегда поглощать из цитоплазмы и подвергать метаболизму, главным образом, олеиновую МЖК. Однако первые одноклеточные, которыми в анаэробных условиях глубин океана были гетеротрофы археи; окисляли в митохондриях, главным образом, пальмитиновую НЖК [18, 19].

Определено это тем, что температура раннего (первого) мирового океана соответствовала изоволюметрическому интервалу воды, 36–42°C. В этих условиях стабильность мембраны клеток могли обеспечить только ФЛ, в каждом из которых в sn-1 (реже и в позиции sn-2 трехатомного спирта глицерина) была этерифицирована пальмитиновая НЖК. Именно пальмитиновую НЖК в цитоплазме, в цикле Кноппа-Линена из уксусной кислоты как субстрата, точнее из ацетил-КоА, синтезировали все одноклеточные археи. При этом *in vivo* доминировал энергетически не самый эффективный пальмитиновый вариант метаболизма ЖК. Какие же реакции *in vivo* были реализованы на ступенях филогенеза, чтобы митохондрии стали реализовать наиболее эффективный олеиновый вариант метаболизма ЖК?

Как же произошло так, что на ступенях филогенеза основная масса эндогенно синтезированной *in vivo* С16:0 пальмитиновой НЖК стала в биохимических реакциях (реакция элонгации и реакция десатурации) субстратом для синтеза ω -9 С18:1 *cis* олеиновой МЖК? Мы полагаем, что на ступенях филогенеза превращения эти оказались успешными далеко не с первой попытки, несмотря на то, что этот процесс *in vivo*, мы полагаем, в большой мере инициировали и неблагоприятные воздействия внешней среды. Через миллионы лет синтеза археями оптимально большого количества пальмитиновой НЖК, температура воды в океане постепенно понизилась почти на порядок.

Количество синтезированной *in situ de novo* пальмитиновой НЖК, которое одноклеточные при высокой температуре океана реализовали в построении клеточных структур, при низкой температуре стало явно излишним. В то же время, использовать пальмитиновую НЖК как субстрат для окисления в митохондриях у одноклеточных тоже невозможно; внутренняя мембрана органелл непроницаема для пальмитиновой НЖК [20]. На ранних ступенях филогенеза, для более легкого проведения пальмитиновой НЖК через внутреннюю мембрану митохондрий, клетки реализовали превращение С16:0 пальмитиновой НЖК в С16:1 пальмитолеиновую МЖК. Для этого одноклеточные экспрессировали новый энзим- пальмитоил-КоА-десатуразу. Однако, согласно полученным нами данным, (см. таблицу), моноеновую пальмитолеиновую МЖК озон окисляет с константой скорости реакции в два раза ниже, чем при окислении *in vitro* пальмитиновой НЖК. Успешным на ступенях филогенеза это биохимическое превращение признать сложно.

Во втором варианте на ступенях филогенеза *in vivo* для активации окисления эндогенной пальмитиновую НЖК в митохондриях, одноклеточные сформировали специфичный транспортер – карнитин пальмитоил ацилтрансферазу [21]. Он призван переносить НЖК через внутреннюю мембрану митохондрий. Посколь-

ку окисление пальмитиновой НЖК на наружной поверхности внутренней мембраны митохондрий не происходит, митохондрии стали переносить в матрикс пальмитиновую НЖК целиком. При этом на наружной поверхности внутренней мембраны митохондрий проходит переэтерификация пальмитиновой НЖК из эфира с тиоспиртом КоА в эфир со спиртом карнитином. В этой форме митохондрии переносят пальмитиновую НЖК через внутреннюю мембрану в матрикс.

На внутренней поверхности внутренней мембраны митохондрий происходит обратная переэтерификация пальмитиновой НЖК из карнитинового эфира пальмитиновой НЖК в тио-эфир, в пальмитоил-КоА. В матриксе митохондрий не столь быстро, как бы хотелось, происходит гидролиз пальмитиновой НЖК на две среднецепочечные ЖК, окисление их цикле Кребса, в дыхательной цепи митохондрий и формирование макроэргического АТФ. Однако и при действии транспортера, митохондрии *in vivo*, как и прежде, окисляли эндогенную пальмитиновую НЖК с явно более низкой константой скорости реакции. Поэтому активность карнитин-пальмитоил-ацилтрансферазы на ступенях филогенеза в полной мере, признать эффективным транспортером оснований явно недостаточно.

На всех ранних ступенях филогенеза, *in vivo*, как у одноклеточных, так и у многоклеточных, доминировал энергетически мало эффективный пальмитиновый вариант метаболизма ЖК [22]. Однако становление на ступенях филогенеза биологической функции локомоции настоятельно требовало формирования *in vivo* более совершенного олеинового варианта метаболизма ЖК; при нем митохондрии могли бы окислять в матриксе преимущественно олеиновую МЖК. На поздних ступенях филогенеза сформировалась острая необходимость биохимического превращения основного количества эндогенной, синтезированной *in situ de novo* пальмитиновой НЖК в олеиновую МЖК и формирование *in vivo* высокоэффективного олеинового варианта метаболизма ЖК. Столь необходимые биохимические превращения в клетках, органах и в организме, на всех трех уровнях относительного биологического «совершенства» реализовал гуморальный медиатор инсулин.

Биологическая функция локомоции, регуляторная роль инсулина

и кинетическое совершенство организмов. Произошло это в рамках становления на поздней ступенях филогенеза биологической функции локомоции – движения за счет сокращения поперечнополосатых, скелетных миоцитов. В течение миллионов лет функциональным предшественником инсулина, полагают, был инсулинподобный фактор роста; регуляторными свойствами инсулина он, однако, не обладал. Тем не менее, инсулинподобный фактор роста реально имеет отношение к регуляции доинсулиновых глюкозных транспортеров как ГЛЮТ-1, ГЛЮТ-2 и ГЛЮТ-3 на плазматической мембране филогенетически более ранних клеток и регуляции метаболизма глюкозы в клетках нервной системы. При формировании биологической функции локомоции, инсулину *in vivo* поручено обеспечить потребности в энергии.

Для реализации биологических потребностей в энергии инсулин экспрессировал формирование *in vivo* новых зависимых от гормона клеток. Ими стали: 1. поперечнополосатые, скелетные миоциты; 2. синцитий кардиомиоцитов; 3. подкожные адипоциты; 4. перипортальные гепатоциты и 5. высоко специализированные макрофаги Купфера в печени. Все инсулинзависимые клетки на плазматической мембране имеют: а) рецепторы для инсулина и б) более эффективные глюкозные транспортеры ГЛЮТ-4. Все зависимые от инсулина клетки реализуют олеиновый вариант метаболизма ЖК. Митохондрии зависимых от инсулина клеток окисляют преимущественно олеиновую МЖК, реализуя высокоэффективный олеиновый вариант метаболизма ЖК.

В зависимых от инсулина клетках, гормон экспрессирует синтез двух новых ферментов: пальмитоил-КоА-элонгазу и стеарил-КоА-десатуразу [23]. В цитоплазме клеток они превращают большую часть синтезированной *in situ de novo* пальмитиновой НЖК в олеиновую МЖК. Происходит это в двух сопряженных биохимических реакциях:

$C16:0 + \text{пальмитоил-КоА-элонгаза} \rightarrow C18:0 \text{ стеариновая НЖК} \rightarrow$

$C18:0 + \text{стеарил-КоА-десатураза} \rightarrow \omega-9 C18:1 \text{ -cis олеиновая МЖК.}$

Инсулин может превратить в олеиновую МЖК только эндогенно синтезированную клетками пальмитиновую НЖК *in situ de novo*, но никак не экзогенную пальмитиновую НЖК, которая поступает с мясной пищей. На ступенях филогенеза функционально это обусловлено разной локализацией процессов во внутриклеточных органеллах (компарментализацией) в клетках пула экзогенной пальмитиновой НЖК и пула эндогенно синтезированного пальмитата.

И чем меньше *Homo sapiens* потребляет углеводов, а клетки менее выражено синтезируют олеиновую МЖК, чем больше пул экзогенной пальмитиновой НЖК поступает с мясной (плотоядной) пищей, тем в большей мере эффективный олеиновый вариант метаболизма ЖК начинает замещать афизиологичный пальмитиновый, формируя в организме хронический дефицит энергии [24]. Связываясь с рецепторами к инсулину на плазматической мембране клеток и выставляя на мембрану клеток дополнительное число ГЛЮТ-4, гормон активирует поглощение клетками глюкозы с целью использовать ее как субстрат для синтеза олеиновой МЖК и выработки энергии в форме АТФ.

Согласно предложенной нами филогенетической теории общей патологии, в океане ранние клетки гетеротрофы археи начали метаболизм ЖК на миллионы лет ранее, чем клетки более поздних автотрофов стали синтезировать и осуществлять метаболизм глюкозы [25]. В силу методологического приема биологической преэминентности в филогенезе, ни одна из клеток *in vivo* из межклеточной среды не поглощает глюкозу, пока возможно поглощать ЖК. Клетки начинают активно поглощать глюкозу только тогда, когда содержание ЖК в межклеточной среде в форме полярных неэтерифицированных ЖК (НЭЖК) в ассоциации с альбумином оказывается сниженным. Так и

осуществлено действие инсулина; гормон, блокируя липолиз в инсулинзависимых подкожных адипоцитах, понижает содержание НЭЖК в межклеточной среде, в плазме крови и только в этих условиях клетки начинают поглощать глюкозу [26].

Согласно филогенетической теории общей патологии, инсулин на поздних ступенях филогенеза регулирует, в первую очередь, ЖК, формируя высокоэффективный олеиновый вариант метаболизма ЖК, синтез *in vivo* максимально возможного количества макроэргического АТФ в единицу времени. И только во вторую очередь, косвенно, гормон задействован в метаболизме глюкозы как субстрата для синтеза олеиновой МЖК. Биологическое предназначение инсулина – обеспечение энергией, в первую очередь, биологической функции локомоции и потребности организма в целом. Основной причиной гипергликемии в плазме крови является синдром резистентности к инсулину – блокада поглощения клетками глюкозы по причине постоянно высокого уровня в крови (в межклеточной среде) НЭЖК: их клетки поглощают со значительно большей константой скорости реакции, чем глюкозу [27].

Если градиент концентрации НЭЖК по обе стороны клеточной мембраны составляет физиологично $\approx 0,8-1,0$ ммоль:следовые количества, то для глюкозы различие составляет всего $0,2-0,3$ ммоль. НЭЖК в цитоплазме инсулинзависимых клеток практически нет, как нет и депонированных ТГ в форме капель липидов. Если в клетках семейство белков переносящих НЭЖК быстро доставляют их от транспортера (CD36 транслоказы ЖК) на клеточной мембране к митохондриям для окисления, то чтобы окислить в митохондриях образованный из глюкозы ацетил-КоА, необходимо предварительно провести десять последовательных реакций гликолиз в цитоплазме. Да и зависимые от инсулина ГЛЮТ-4 являются пассивными транспортерами, функция которых определена градиентом глюкозы межклеточная среда \leftrightarrow цитоплазма.

Согласно предложенной нами филогенетической теории общей патологии, биологическое предназначение инсулина, состоит в превращении плотоядных (рыбоядных) видов океана в травоядные на суше. Когда животные не по своей воле оказались на суше, где нет плотоядной (рыбной) пищи, а экзогенная пища представлена растениями, клетчаткой, углеводами и глюкозой, инсулин за миллионы лет сформировал синтез из глюкозы *in situ de novo* олеиновой МЖК и эффективный олеиновый вариант метаболизма ЖК. На ступенях филогенеза на суше инсулин исполнил историческую роль – осуществил превращение плотоядных (рыбоядных) животных океана в травоядные виды.

Травоядным в филогенезе стал и вид *Homo sapiens*, человек разумный. В наследство травоядному человеку от плотоядного периода жизни в океане осталось способность каждой из клеток синтезировать из уксусной кислоты (из ацетата) пальмитиновую НЖК в цикле Кноппа-Линена. И только зависимые от инсулина клетки могут превратить эндогенно синтезированный пальмитат в олеиновую МЖК. Как наследство от рыбоядного (плотоядного) питания при

жизни в океане, травоядный человек вскармливает новорожденных молоком матери. Специфическими, «конечными» липидами в молоке матери являются, главным образом, пальмитиновые ТГ с малым количеством этерифицированной в них олеиновой МЖК [28]. Наследством из раннего филогенеза стал и синтез специфического ФЛ клеток эпителия альвеол легких в форме выражено гидрофобного сурфактанта – дипальмитоил фосфатидилхолина.

Согласно филогенетической теории общей патологии, синдром резистентности к инсулину и большинство случаев гипергликемии у пациентов с ИБС является патологией метаболизма, в первую очередь, ЖК. Гипергликемия – функциональное нарушение, инициированное постоянно высоким содержанием в межклеточной среде НЭЖК. И нет оснований именовать столь частые функциональные нарушения, синдром резистентности к инсулину сахарным диабетом второго типа [29]. Основной причиной столь высокой частоты синдрома резистентности к инсулину [30], атеросклероза, атероматоза и ИБС является забвение *Homo sapiens* того, что филогенетически он травояден (в прошлом рыбаоден), но никак не мясоед. И злоупотребление мясной пищей с высоким содержанием экзогенной пальмитиновой НЖК является основной причиной формирования синдрома резистентности к инсулину [31].

Может показаться необычным, что мы начали статью с изложения констант скорости реакции окисления озоном индивидуальных ЖК, а заканчиваем описанием биохимических событий на ступенях филогенеза. Реально же основами биологического совершенства организмов на ступенях филогенеза являются, в первую очередь: а) физико-химические параметры субстратов; б) кинетика биохимических реакций и в) воздействие факторов внешней среды. На протяжении миллионов лет на всех ступенях филогенеза позитивные изменения *in vivo* направлены в сторону все большего кинетического (биологического) совершенства организмов [16], становления биологической функции локомоции.

Обобщая изложенное, можно сказать, что физико-химическое различие параметров окисления озоном пальмитиновой НЖК и олеиновой МЖК в филогенезе (эволюции) является одним из основополагающих факторов становления последовательно: а) реакций синтеза пальмитолеиновой МЖК; б) формирования карнитин пальмитоил ацилтрансферазы как транспортера НЖК в митохондрии и наконец в) синтеза *in vivo* олеиновой НЖК при гуморальном, регуляторном действии инсулина. В стремлении к более высоким кинетическим параметрам организмов невозможно изменить физико-химические и биохимические реакции в матриксе митохондрий, но можно обеспечить митохондрии таким субстратом, который даст органеллам возможность выражено увеличить эффективность функционирования и количество нарабатываемого ими АТФ. Физико-химические параметры олеиновой МЖК явились эталоном субстрата окисления при наработке *in vivo* энергии [6], синтезировать которую организмы стремились в филогенезе многие миллионы лет. Вторым основополагающим фактором становления кинетического совершенствования орга-

низмов на ступенях филогенеза явилось воздействие факторов внешней среды. Бывают ли они благоприятными, чаще нет, но они формируют жесткие условия, которые во многом стимулируют все приспособительные (адаптивные) функции организма, в том числе биологическую функцию локомоции, когнитивную функцию – функцию позиционирования вида (особи) в окружающей среде и в столь разнообразном мире.

И миллионами лет сформированное биологическое, энергетическое, кинетическое совершенство *in vivo* можно столь легко нарушить, если травоядный в филогенезе *Homo* не всегда *sapiens* начинает злоупотреблять плотоядной мясной пищей [32]; ее на ступенях филогенеза ни предки человека, ни сам человек никогда не употреблял. Это и есть основная причина столь частого распространения в популяции метаболических пандемий как синдром резистентности к инсулину, атеросклероз и атероматоз, ожирение и неалкогольная жировая болезнь печени [33]. И самые эффективные методы профилактики метаболических пандемий, ИБС и инфаркта миокарда до наивности просты. Человек должен всегда оставаться травоядным.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 14, 15, 17-24, 27-33 REFERENCES)

1. Титов В.Н., Лисицын Д.М. Содержание спиртов холестерина и глицерина в плазме крови зависит от числа двойных связей жирных кислот в пуле липидов липопротеинов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2006; 42(11): 521 – 4.
2. Сажина Н.Н., Титов В.Н., Евтева Н.М., Ариповский А.В. Изменение суммарной ненасыщенности жирных кислот липидов плазмы крови больных артериальной гипертензией в глюкозотолерантном тесте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(2): 74 – 80.
3. Рожкова Т.А., Ариповский А.В., Яровая Е.Б., Каминная В.И., Кухарчук В.В., Титов В.Н. Индивидуальные жирные кислоты плазмы крови: биологическая роль субстратов, параметры количества и качества, диагностика атеросклероза и атероматоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(11): 655 – 65.
4. Лисицын Д.М., Разумовский С.Д., Тишин М.А., Титов В.Н. Кинетические параметры окисления озоном индивидуальных жирных кислот. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004; 138(11): 517 – 9.
5. Рощина В.В. *Озон и живая клетка. Учебное пособие к спецкурсу*. Пушино: Аналитическая микроскопия; 2009.
6. Титов В.Н., Сажина Н.Н., Ариповский А.В., Евтева Н.М., Тибилова О.А., Кухарчук В.В. Определение ненасыщенности липидов крови методами физической химии и клинической биохимии. Регуляция инсулином метаболизма жирных кислот, числа двойных связей и поглощения клетками глюкозы. *Кардиологический вестник*. 2016; 2: 74 – 80.
7. Веденев В.И. Энергия разрыва С-Н-связей в углеводородах. *Доклады Академии наук СССР*. 1957; 114(3): 571 – 4.
8. Киреев В.А. *Курс физической химии*. 3 издание. М., 1975.
9. Иванов К.И. *Промежуточные продукты и промежуточные реакции автоокисления углеводородов*. М.-Л.: Гостоптехиздат; 1949.
10. Строев Е.А. *Биологическая химия*. М.: Высшая школа; 1986.
11. Сваровская Н.А., Зеленко И.Ю. Перспективный подход в моделировании процессов переработки углеводородного сырья. *Наука и технология углеводородов*. 2003; 4: 59 – 67.

12. Матьков К.Г. Уравнения расчета энергетического и водного баланса катаболизма жирных кислот и триглицеролов, коэффициент эффективности и сравнительная биоэнергетика. *Успехи современного естествознания*. 2007; 3: 89 – 91.
13. Воеводский В.В. Эмпирические уравнения для вычисления энергий диссоциации СН- и СС- связей в молекулах насыщенных углеводородов и в свободных алифатических радикалах. *Доклады Академии наук СССР*. 1951; 79(3): 455 – 8.
16. Шноль С.Э. *Физико-химические факторы биологической эволюции*. М.: Наука; 1979.
25. Титов В.Н. Филогенетическая теория становления болезни, теория патологии, патогенез «метаболических пандемий» и роль клинической биохимии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 10: 5 – 13.
26. Титов В.Н. *Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. Сахарный диабет*. М.: ИНФРА-М; 2014.
14. Holloway G.P., Bezaire V., Heigenhauser G.J., Tandon N.N., Glatz J.F., Luiken J.J. Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase activity in human skeletal muscle during aerobic exercise. *J. Physiol.* 2006; 571(Pt 1): 201 - 10.
15. Valero T. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. *Curr. Pharm. Des.* 2014; 20(35): 5507 - 9.
16. Shnol S.E. *Physicochemical factors of biological evolution. [Fiziko-khimicheskiye faktory biologicheskoy evolyuzii]*. Moskva. Izdatel'stvo "Nauka". 1979. (in Russian)
17. Laxman S. Conceptualizing Eukaryotic Metabolic Sensing and Signaling. *J. Indian. Inst. Sci.* 2017; 97(1): 59 - 77.
18. Egnatchik R., Leamy A.K., Noguchi Y., Shiota M., Young J.D. Palmitate-induced activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative stress and apoptosis in H4IIEC3 rat hepatocytes. *Metabolism*. 2014; 63(2): 283 - 95.
19. Constantinescu S., Turcotte L.P. Amelioration of palmitate-induced metabolic dysfunction in L6 muscle cells expressing low levels of receptor-interacting protein 140. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2015; 93(11): 913 - 22.
20. Yang C., Aye C.C., Li X., Diaz Ramos A., Zorzano A., Mora S. Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells. *Biosci. Rep.* 2012; 32(5): 465 - 78.
21. Longo N., Frigeni M., Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1863(10): 2422 - 35.
22. Hirabara S.M., Curi R., Maechler P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 2010; 222(1): 187 - 94.
23. Stamatikos A.D., Paton C.M. Role of stearyl-CoA desaturase-1 in skeletal muscle function and metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2013; 305(7): E767 – E775.
24. Niu Y., Li S., Na L., Feng R., Liu L., Li Y., Sun C. Mangiferin decreases plasma free fatty acids through promoting its catabolism in liver by activation of AMPK. *PLoS One.* 2012; 7(1): e30782.
25. Titov V.N. Phylogenetic theory of disease formation, pathology theory, pathogenesis of “metabolic pandemics” and the role of clinical biochemistry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 10: 5 – 13. (in Russian)
26. Titov V.N. *Phylogenetic theory of general pathology. The pathogenesis of metabolic pandemics. Diabetes. [Filogenicheskaya teoriya obschey patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemiy. Sakharniy diabet]*. Moscow: INFRA-M; 2014. (in Russian)
27. Dias C.B., Amigo N., Wood L.G., Correig X., Garg M.L. Effect of diets rich in either saturated fat or n-6 polyunsaturated fatty acids and supplemented with long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on plasma lipoprotein profiles. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2017; 71(11): 1297 - 1302.
28. Fillipou A., Teng K.T., Berry S.E., Sanders T.A. Palmitic acid in the sn-2 position of dietary triacylglycerols does not affect insulin secretion or glucose homeostasis in healthy men and women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2014; 68(9): 1036 -41.
29. Anthanont P., Ramos P., Jensen M.D., Hames K.C. Family history of type 2 diabetes, abdominal adipocyte size and markers of the metabolic syndrome. *Int. J. Obes (Lond)*. 2017; 41(11): 1621 - 6.
30. Samuel V.T., Petersen K.F., Shulman G.I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*. 2010; 375(9733): 2267 - 77.
31. Quiles L., Portolés O., Sorlí J.V., Corella D. Short term effects on lipid profile and glycaemia of a low-fat vegetarian diet. *Nutr. Hosp.* 2015; 32(1): 156 - 64.
32. Goswami H.K., Ram H.K. Ancient Food Habits Dictate that Food Can Be Medicine but Medicine Cannot Be “Food”. *Medicines (Basel)*. 2017; 4(4): E82 - E88.
33. Torres N., Guevara-Cruz M., Velázquez-Villegas L.A., Tovar A.R. Nutrition and Atherosclerosis. *Arch. Med. Res.* 2015; 46(5): 408 - 26.

REFERENCES

1. Titov V.N., Lisitsyn D.M. The content of alcohols of cholesterol and glycerin in the blood plasma depends on the number of double bonds of fatty acids in the lipid lipoprotein pool. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2006; 42(11): 521 – 4. (in Russian)
2. Sazhina N.N., Titov V.N., Evteeva N.M., Aripovskiy A.V. Change in total unsaturation of fatty acids of blood plasma lipids in patients with arterial hypertension in a glucose-tolerant test. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(2): 74 – 80. (in Russian)
3. Rozhkova T.A., Aripovsky A.V., Yarovaya E.B., Kaminskaya V.I., Kukharchuk V.V., Titov V.N. Individual fatty acids of blood plasma: the biological role of substrates, the parameters of quantity, the diagnosis of atherosclerosis and atheromatosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(11): 655 – 665. (in Russian)
4. Lisitsyn D.M., Razumovskiy S.D., Tischenin M.A., Titov V.N. Kinetic parameters of individual ozone oxidation of fatty acids. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2004; 138(11): 517 – 9. (in Russian)
5. Roschina V.V. *Ozone and a living cell. Textbook for special courses. [Ozon i zhivaya kletka. Uchebnoe gosizdat k spetskursu]*. Puschino: Analiticheskaya mikroskopiya; 2009. (in Russian)
6. Titov V.N., Sazhina N.N., Aripovskiy A.V., Evteeva N.M., Tibilova O.A., Kukharchuk V.V. Determination of unsaturation of blood lipids by physical chemistry and clinical biochemistry. Regulation of insulin metabolism of fatty acids, the number of double bonds and the absorption of glucose by cells. *Kardiologicheskij vestnik*. 2016; 2: 74 – 80. (in Russian)
7. Vedenev V.I. Energy of rupture of C-H-bonds in hydrocarbons. *Doklady Akademii nauk SSSR*. 1957; 114(3): 571 – 4. (in Russian)
8. Kireev V.A. *Course of physical chemistry. [Kurs fizicheskoy khimii]*. 3rd izdanie. Moscow; 1975. (in Russian)
9. Ivanov K.I. *Intermediate products and intermediate reactions of auto-oxidation of hydrocarbons. [Promezhutochnye produkty i promezhutochnye reaktsii avtookisleniya uglevodorodov]*. Moscow-Leningrad: Gosoptechizdat; 1949. (in Russian)
10. Stroev E.A. *Biological chemistry. [Biologicheskaya khimiya]*. Moscow: Vysshaya shkola; 1986. (in Russian)
11. Svaroskaya N.A., Zelenko I.Yu. A promising approach in modeling hydrocarbon processing processes. *Nauka i tekhnologiya uglevodorodov*. 2003; 4: 59 – 67. (in Russian)
12. Mat'kov K.G. Equations for calculating the energy and water balance of catabolism of fatty acids and triglycerols, efficiency factor and comparative bioenergetics. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2007; 3: 89 – 91. (in Russian)
13. Voevodskiy V.V. Empirical equations for calculating the dissociation energies of CH and CC bonds in saturated hydrocarbon molecules and in free aliphatic radicals. *Doklady Akademii nauk SSSR*. 1951; 79(3): 455 – 8. (in Russian)

Поступила 25.02.2019
Принята к печати 01.03.2019

© КОВЯЗИНА Н.А., АЛХУТОВА Н.А., 2019

Ковязина Н. А., Алхутова Н.А

ИНДЕКС ДГЭАС/КОРТИЗОЛ КАК МАРКЕР СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННОГО ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ

ФГБУ Всесоюзный Центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России, 194044, Санкт-Петербург, Россия

Выявление стресс-индуцированного преждевременного старения с целью коррекции повреждающих адаптивных эффектов представляется на сегодняшний день актуальным. В статье обсуждается использование индекса ДГЭАС/кортизол в качестве скринингового маркера ускорения темпа биологического старения у лиц, подвергающихся воздействию стресса.

Ключевые слова: индекс ДГЭАС/кортизол; преждевременное старение.

Для цитирования: Ковязина Н.А., Алхутова Н.А. Индекс ДГЭАС/кортизол как маркер стресс-индуцированного преждевременного старения. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (3): 140-144. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-140-144>

Kovyazina N.A., Alhutova N.A.

DHEAS/CORTISOL INDEX AS A MARKER OF STRESS-INDUCED PREMATURE AGING

Federal State Budgetary Institution "The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine", The Ministry of the Russian Federation for Civil Defence, Emergencies and Elimination of Consequences of Natural Disasters, 194044, Saint-Petersburg, Russia

The detection of stress-induced premature aging with the aim of correcting damaging adaptive effects seems to be actual today. The article discusses the use of the DHEAS / cortisol index as a screening marker for accelerating the rate of biological aging in people exposed to stress.

Key words: DHEAS/cortisol index; premature aging.

For citation: Kovyazina N.A., Alhutova N.A. DHEAS/cortisol index as a marker of stress-induced premature aging. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (3): 140-144 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-140-144>

For correspondence: Kovyazina N.A., zav. lab. EMERCOM of Russia; e-mail: nakovzn@gmail.com

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 23.10.2018
Accepted 28.02.2019

Введение. В соответствии с прогнозом ООН к 2050 г. численность населения России сократится примерно на 30%. Данные Росстата свидетельствуют о незначительном росте в 2017 г. средней продолжительности жизни в России, однако для мужчин это показатель составляет всего 66,5 лет. В то же время известно, что длительное или интенсивное воздействие стрессовых факторов физической, эмоциональной либо иной природы вызывает избыточную адаптивную реакцию организма, в ходе которой основные адаптивные эффекты трансформируются в повреждающие и в сочетании с генетическими факторами приводят к ускорению и качественному искажению естественных механизмов биологического старения, формированию соматической патологии, а также преждевременной смертности [1]. Таким образом, выявление стресс-индуцированного преждевременного старения с целью коррекции повреждающих адаптивных эффектов представляется на сегодняшний день актуальным.

Для корреспонденции: Ковязина Надежда Алексеевна, канд. мед. наук, зав. лаб. серологических исследований и аллергодиагностики отдела лаб. диагностики; e-mail: nakovzn@gmail.com

Еще в начале XX века Г. Селье обратил внимание на тот факт, что адаптивная реакция организма на стрессоры различного генеза во многом единообразна и опубликовал теорию «общего адаптивного синдрома», последняя стадия которого по своей сути аналогична процессу естественного старения и характеризуется изменениями, которые Г. Селье назвал «wear@tear» (изнашивание). На сегодняшний день осуществлено много попыток поиска связи между патогенетическими механизмами реакции адаптации, приводящими к преждевременному старению, и лабораторными показателями. Так, в соответствии с теорией общего адаптивного ответа одна из наиболее значимых ролей в формировании его последствий принадлежит глюкокортикоидам [2, 3]. Однако широкий референсный диапазон вследствие высокой биологической и индивидуальной вариацией глюкокортикоидов, а также зачастую отсутствие корреляции между биохимическими и физиологическими показателями, обусловленное активацией компенсаторных защитных механизмов, составляют определенные трудности при трактовке результатов соответствующих лабораторных исследований и не позволяют использовать определение

концентрации глюкокортикоидов, в частности, кортизола, в качестве лабораторного маркера стресса и стресс-индуцированного преждевременного старения [4-7]. В ходе научного исследования, посвященного изучению состояния здоровья участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС (ЛПА), подвергшихся действию комплекса стрессоров (радиационное излучение, острый и хронический эмоциональный стресс), мы смогли выявить взаимосвязи между концентрацией в крови глюкокортикоидов и ускорением процессов старения. В частности, нами было показано, что значительное (до 10 лет) превышение биологического возраста над календарным сопровождалось у участников ЛПА монотонной в течение суток секрецией кортизола, с незначительным ее снижением в вечерние часы. Однако, данные изменения наблюдались на фоне не выходящих за пределы референтных значений дневных показателей секреции гормона, что не позволяет использовать определение концентрации кортизола в крови в качестве скринингового маркера стресса [4, 8].

В настоящее время также активно обсуждается предположение, что изменение гонадотропной функции гипофиза является не менее важным этапом как инволюционных, так и стресс-индуцированных изменений. Выявлено, что у 5-7% мужчин в возрасте 40-49 лет развивается синдром возрастного андрогенного дефицита, при этом такие экзогенные факторы, как курение, нарушение диеты, ограничение физической нагрузки и эмоциональный стресс существенно ускоряют темп его развития, а также сопутствующих ему заболеваний [5, 9, 10]. Известно, что наличие хронических заболеваний (сахарный диабет, артериальная гипертензия, ишемическая болезнь) сопутствуют более низкому (на 10-15% относительно здоровых лиц) уровню тестостерона. Мы также выявили снижение концентрации тестостерона у участников ЛПА по мере ускорения темпов биологического старения [4]. Кроме того, развитию относительного андрогенного дефицита и уменьшению соотношения тестостерон/эстрадиол способствует усиление ароматизации андрогенов в жировой ткани, массовая доля которой увеличивается с возрастом.

Снижение уровня надпочечникового андрогена, дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭАС), также рассматривается в качестве одной из предпосылок развития ассоциированных со старением заболеваний. Установлена взаимосвязь между уровнем ДГЭАС в крови и тяжестью заболеваний сердечнососудистой системы. По данным некоторых авторов риск преждевременного инфаркта у мужчин обратно пропорционален уровню ДГЭАС независимо от других факторов риска. Известно, что ДГЭАС оказывает стресспротективное действие на ЦНС за счет модулирования функции рецепторов нейромедиаторов и тем самым защищает ЦНС от негативных последствий повышения уровня кортизола. Доказано, что клинически негативные эффекты кортизола наиболее часто проявляются именно на фоне истощения резерва анаболических гормонов [7].

Мы также наблюдали значительное снижение уровня ДГЭАС у участников ЛПА, подвергшихся действию целого комплекса стрессовых факторов. При лабораторном обследовании мы наблюдали у них двукратное снижение уровня ДГЭАС относительно контрольной группы. Кроме того в группе участников ЛПА по сравнению с контрольной группой чаще фиксировались жалобы на ту или иную степень мочеполовых, вегетососудистых, нервных и соматических расстройств, что характерно для клинической картины инволюционного гипогонадизма [4]. Тем не менее, при обследовании группы лиц, подвергшихся воздействию менее агрессивного стрессора, мы столкнулись с проблемой низкой клинической информативности результатов исследования уровня ДГЭАС, поскольку уровень ДГЭАС лишь в 7% наблюдений выходил за пределы референтного диапазона. Таким образом, клиническая информативность изолированного исследования уровня ДГЭАС является в настоящее время достаточно ограниченной, что не позволяет активно использовать этот тест на практике для своевременной профилактики стресс-индуцированного преждевременного старения.

В связи с вышесказанным, принимая во внимание представление о кортизоле и ДГЭАС как о наиболее значимых в процессах преждевременного старения гормонах-антагонистах, мы рассчитали их соотношение и выявили, что у участников ЛПА с доказанным стресс-индуцированным ускорением темпов старения величина индекса ДГЭАС/кортизол была более чем в 2 раза ниже, чем в контрольной группе здоровых лиц. На основании данных, полученных в результате динамического наблюдения за состоянием здоровья участников ЛПА с 2005 по 2015 гг., нами было выдвинуто предположение, что индекс ДГЭАС/кортизол может быть использован как доминирующий маркер преждевременного старения у участников ЛПА.

Цель исследования – оценить возможность использования индекса ДГЭАС/кортизол в качестве маркера стресс-индуцированного ускорения темпа биологического старения у лиц, подвергающихся воздействию профессионального стресса.

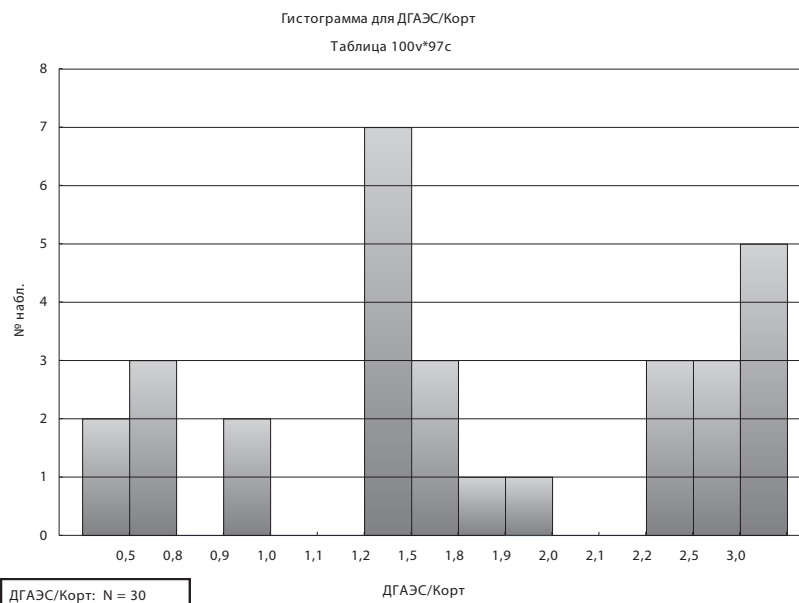
Материал и методы. Материалом служили образцы сыворотки крови 30 мужчин среднего возраста (ВОЗ), сотрудников МЧС, которые проходили плановое амбулаторное или стационарное лечение, либо профилактическое обследование во ВЦЭРМ в 2017 г. и наблюдались специалистами различного клинического профиля. Мужчины имели избыточную массу тела (ИМТ от 25 до 40). К наиболее часто предъявляемым жалобам относились следующие: головная боль и головокружение, усиливающиеся после эмоциональной нагрузки, а также повышенная утомляемость и боли слабой интенсивности различной локализации.

Определение концентрации концентрации дегидроэпиандростерон-сульфата, кортизола, тестостерона общего, эстрадиола выполнены с использованием иммунохемилюминесцентных автоматических анализаторов закрытого типа «ИММУЛАЙТ ХРi» (Siemens, Германия) и «ACCESS-2» (Beckman Coulter, США).

Поскольку в данном исследовании основная роль была нами возложена на использование расчётных параметров, то аналитические характеристики используемых методов исследования приобрели особую значимость. Разнонаправленные смещения результатов измерения показателей при расчете их соотношения могут привести к клинически значимой ошибке. Таким образом, для расчета индекса не могут быть использованы методы, уровень точности которых ниже базового. Уровень точности тестов и расширенная неопределенность результатов оценивались нами в соответствии с национальными стандартами ГОСТ Р 53022-2008 «Требования к качеству клинических лабораторных исследований», ГОСТ Р 54500-2011 «Неопределенность измерений» и актуальной информацией на сайте westgard.com с использованием независимого аттестованного трёхуровневого контрольного материала «Lyphocheck immunoassay Plus», «Bio-Rad» (США), а также по результатам участия в международной программе внешнего контроля качества External Quality Assurance Services (EQAS) «Bio-Rad», США. Уровень точности расчетных индексов (DHEAS/кортизол и эстрадиол/тестостерон) обуславливался уровнями точности составляющих параметров и обеспечивался удовлетворительной стабильностью качества их измерения (от 4 до 6 сигм). Показатели точности результатов, стабильности качества исследований и характеристика систем реагентов указаны в табл. 1.

Обработку результатов проводили при помощи лабораторной информационной системы qLIS «СПАРМ». Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ «Excel-2000» и «Statistica 10.0». Для сравнения полученных данных использовали критерий Краскела-Уоллиса. Данные в тексте и таблицах представлены в виде $M \pm SD$ (M - средняя арифметическая, SD среднеквадратичное отклонение, Me - медиана). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Средние значения результатов лабораторных исследований обследованных мужчин находились в референтных пределах (табл. 2). Только у одного из 30 мужчин (3%) уровень кортизола в сыворотке крови был ниже референтного



Распределение обследованных мужчин в зависимости от индекса ДГЭАС/кортизол.

диапазона, и в двух случаях (7%) выявлены патологически низкие значения концентрации ДГЭАС. Тем не менее, сопоставление медианы индекса ДГЭАС/кортизол показало значительное снижение значения этого показателя в общей группе относительно медианы референтного диапазона (МРД).

Оценка распределения величин индекса ДГЭАС/кортизол позволила нам выделить в общей группе три подгруппы (см. рисунок).

При анализе данных историй болезни оказалось, что в первой подгруппе, в которую были включены обследованные с наиболее низким уровнем индекса ДГЭАС/кортизол, частота выявления высоких эмоциональных нагрузок была наиболее высокой и составила 71% против 50% и 36% в группах 2 и 3 соответственно (см. табл. 2). Количество нозологий в выписных эпикризах во всех трех подгруппах также различалось. Наименьший показатель был отмечен в третьей подгруппе, в которой один обследованный был выписан с заключением «Практически здоров». Корреляционный анализ показал наличие средней силы отрицательной связи между количеством нозологий и величиной индекса ДГЭАС/кортизол ($r = -0,6$), что превышало силу связи как с возрастом пациентов, так и с уровнем ДГЭАС.

Таблица 1

Показатели точности результатов, стабильности качества исследований и характеристика систем реагентов

| Показатель | Аналитическая чувствительность | Рабочий диапазон | Уровень точности по ГОСТ 53022.1-2008 и westgard.com | Расширенная неопределенность для доверительного 95,5% диапазона, % | Стабильность качества на установленном уровне точности, сигмы |
|-------------|--------------------------------|-----------------------|--|--|---|
| DHEAS | 0.08 мкмоль/л | 0.41 – 27.00 мкмоль/л | базовый | 10 | 4 |
| Эстрадиол | 55 пмоль/л | 73 – 7342 пмоль/л | базовый | 19 | 4 |
| Тестостерон | 0.5 нмоль/л | 0.7 – 55.0 нмоль/л | минимальный | 11 | 5 |
| Кортизол | 11 нмоль/л | 11 – 1655 нмоль/л | базовый | 16 | 4 |

Результаты обследования сотрудников МЧС, мужчин группы сравнения и участников ЛПА на ЧАЭС

| Показатель | Группа сравнения | ЛПА | p | Сотрудники МЧС | | | | p<0,05 между подгруппами | Референсный диапазон | |
|---------------------------------|------------------|-------------|-------|--|---------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|---------|
| | | | | Общая группа | Подгруппы | | | | Границы | Медиана |
| | | | | | 1 | 2 | 3 | | | |
| n | 19 | 68 | | 30 | 7 | 12 | 11 | | | |
| Количество нозологий в диагнозе | - | - | - | 5,3±2,7 | 7,4±1,7 | 6,1±2,6 | 3,6±2,5 | 1 и 2, 2 и 3, 1 и 3 | - | - |
| Возраст, годы | 45,2 ± 6,2 | 48,4 ± 7,2 | - | 46,0±6,5 | 52,1±7,3 | 46,6±5,1 | 41,5±3,5 | 1 и 3 | - | - |
| ИМТ, кг/м ² | 28,0±3,8 | 28,5±6,7 | - | 27,5±3,4 | 27,8±3,68 | 27,0±3,5 | 28,0±3,3 | - | < 25 | - |
| Общий тестостерон, нмоль/л | 13,6 ± 3,1 | 11,9 ± 4,1 | - | 11,4 ± 3,9 Me=11,7 1-й кв.= 8,6 3-й кв.= 14,2 | 8,6 ± 4,6 Me=8,5 | 12,1 ± 3,5 Me=13,3 | 12,6 ± 3,3 Me=12,7 | - | 7,0-28,0 | 14,2 |
| Эстрадиол, пмоль/л | 90 ± 22 | 188 ± 74 | <0,05 | 169 ± 47 Me=155 1-й кв.= 144 3-й кв.= 204 | 183 ± 41 Me=155 | 176 ± 57 Me=171 | 152 ± 39 Me=151 | - | < 205 | 109,0 |
| Тестостерон/эстрадиол, % | 15,1±7,0 | 6,3±2,7 | <0,05 | 7,5±4,2 Me=6,7 1-й кв.= 5,0 3-й кв.= 9,0 | 4,6±2,1 Me=4,3 | 8,1±5,3 Me=6,7 | 9,0±3,0 Me=8,5 | 1 и 3 | - | 13,0 |
| ДГЭАС-С, мкмоль/л | 7,7 ± 4,4 | 3,5 ± 1,6 | <0,05 | 5,4 ± 3,4 Me=4,5 1-й кв.= 3,2 3-й кв.= 6,5 | 2,2 ± 0,9 Me=2,4 | 4,3 ± 1,2 Me=3,8 | 8,7± 3,3 Me=7,8 | 1 и 3 2 и 3 | 2,2-15,2 | 7,6 |
| Кортизол, нмоль/л | 350 ± 166 | 484 ± 264 | - | 295 ± 103 Me=276 1-й кв.= 220 3-й кв.= 364 | 355 ± 77 Me=359 | 288 ± 100 Me=273 | 265 ± 111 Me=243 | - | 138-690 | 370 |
| ДГЭАС/кортизол, % | 2,21 ± 0,15 | 0,71 ± 0,03 | <0,05 | 2,1 ± 1,9 Me=1,7 1-й кв.= 1,3 3-й кв.= 2,7 | 0,7 ± 0,3 Me=0,6 | 1,5 ± 0,3 Me=1,4 | 3,7 ± 2,4 Me=2,9 | 1 и 3, 2 и 3 | - | 2,1 |

Принимая во внимание единые для всех действующих стрессоров механизмы адаптации, мы сопоставили результаты обследования сотрудников МЧС, группы сравнения (здоровые мужчины) и участников ЛПА, обследованных нами в 2003-2005 гг. и подвергшихся действию целого комплекса повреждающих факторов.

При том, что в 90% случаев результаты определения концентрации ДГЭАС и кортизола у обследованных мужчин не выходили за пределы референтного диапазона, величина индекса ДГЭАС/кортизол в подгруппе 1 была сопоставима с таковой у участников ЛПА. Также сопоставимы и максимально приближены к референтной медиане были значения индекса ДГЭАС/кортизол в группе сравнения и подгруппе 3.

Средний уровень общего тестостерона в подгруппе 1 был на 30% ниже, чем у участников ЛПА. Нами также было выявлено, что средние уровни эстрадиола в подгруппах 1,2,3 и участников ЛПА превышали таковой в группе сравнения почти в два раза и стремились к верхней границе референтного диапазона, в то время как индекс массы тела у всех обследованных был сопоставим. Как было указано выше, повышение ароматизации андрогенов в жировой ткани в эстрогены на фоне снижения секреции тестостерона усугубляет андрогенный дефицит. Нами было отмечено, что среднее

значение отношения тестостерон/эстрадиол в подгруппе 1 было почти в два раза ниже, чем в подгруппах 2 и 3 (см. табл. 2).

Относительные снижение уровня общего тестостерона, а также снижение индекса ДГЭАС/кортизол ранее были нами связаны с ускорением темпа биологического старения участников ЛПА, биологический возраст которых более чем на 10 лет превышал паспортный (определялся у участников ЛПА в 2003 г. по методике Войтенко В.П.). Результаты настоящего исследования показали, что направленность изменений гормонального статуса у сотрудников МЧС, вошедших в подгруппу 1, аналогична таковым, выявленным у участников ЛПА в исследовании 2003-2005 гг., при этом степень аналогичных изменений уровней гормонов не только соизмерима, но и в некоторых случаях превышает таковые у участников ЛПА, несмотря на их сопоставимость по возрасту и ИМТ. Таким образом, можно предположить, что у обследованных, индекс ДГЭАС/кортизол у которых был ниже 1,1, также имеет место ускорение темпов биологического старения. Представленные данные укладываются в теорию общего адаптивного ответа, третья стадия которого, стадия истощения, по своей сути представляет модель преждевременного старения.

Заключение. Представляется крайне перспективным проведение расширенного исследования по изучению индекса ДГЭАС/кортизол в качестве скринингового маркера ускорения темпа биологического старения у лиц, подвергающихся воздействию стресса.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 10 REFERENCES)

1. Меерсон З.Ф., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и нагрузкам. М: Медицина; 1993.
2. Филаретов А.А. Адаптация как функция гипофизарно-адrenalовой системы. СПб: Наука; 1994.
4. Алхутова Н.А. Клинико-лабораторные критерии ускорения темпов старения участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС. *Дисс. канд. биол. наук.* СПб; 2005.
5. Дедов И.И., Калинин С.Ю. Возрастной андрогенный дефицит у мужчин. М: Практическая медицина; 2006.
6. Лабазник Л.Б., Верткин А.Л., Конев Ю.В., Ли Е.Д., Скотников А.С. Старение: Профессиональный врачебный подход. М.: Эксмо; 2014.
7. Тодоров И.Н., Тодоров Г.И. Стресс, старение и их биохимическая коррекция. М.: Наука; 2003.
8. Алхутова Н.А., Ковязина Н.А., Зыбина Н.Н. Анализ гормональных изменений, влияющих на ускорение темпов старения участников ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС через 18 и 28 лет. *Медико-биологические и социально-психологические проблемы в чрезвычайных ситуациях.* 2016; 1: 64-70.
9. Калинин С.Ю. Возрастные изменения состояния гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системы у мужчин старшей возрастной группы. *Международный эндокринологический журнал.* 2007; 4(10):30-41.

REFERENCES

1. Meyerson Z.F., Pshennikova M.G. Adaptation to stress situations and loads [Adaptatsiya k stressornym situatsiyam i nagruzkam]. Moscow: Meditsina; 1993. (in Russian)
2. Filaretov A.A. Adaptation as a function of the pituitary-adrenal system [Adaptatsiya kak funktsiya gipofizarno-adrenalovoy sistemy]. St.Petersburg: Nauka; 1994. (in Russian)
3. Gust D.A., Wilson M.E., Stocker T. et al. Activity of Hypothalamic-pituitary-adrenal axis is altered by aging and exposure to social stress in female rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrin.* 2000; 7: 2556-63.
4. Alkhutova N.A. Clinical and laboratory criteria for accelerated aging of Chernobyl Accident consequences liquidators. Diss. St.Petersburg; 2005. (in Russian)
5. Dedov I.I., Kalinichenko S.Yu. Age-related androgen deficiency in men. [Vozrastnoy androgenny deficit u muzhchin]. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2006. (in Russian)
6. Labaznik L.B., Vertkin A.L., Konev Yu.V., Li E.D., Skotnikov A.S. Aging: a Professional medical approach. [Stareniye: Professionalnyy vrachebnyy podhod]. Moscow; 2014. (in Russian)
7. Todorov I.N., Todorov G.I. Stress, aging and their biochemical correction. [Stress, starenie i ih biohimicheskaya korrektsiya]. Moscow: Nauka; 2003. (in Russian)
8. Alkhutova N.A., Kovyazina N.A., Zibina N.A. Analysis of hormonal changes that contribute to accelerated aging of Chernobyl accident consequences liquidators after 18 and 28 years. *Mediko-biologicheskie i sotsial'no-psikhologicheskie problemy v chrezvychaynykh situatsiyakh.* 2016; 1: 64-70. (in Russian)
9. Kalinichenko S.Yu. Age-related changes of the status of the hypothalamic-pituitary-testicular system in men of older age groups. *Mezhdunarodnyi endokrinologicheskii zhurnal.* 2007; 4(10): 30-41. (in Russian)
10. Kunz - Ebrecht SR, Kirschbaum C, Steptoe A. Work stress, socioeconomic status and neuroendocrine activation over the working day. *Soc. Sci. Med.* 2004; 58: 1523-30.

Поступила 23.10.18
Принята к печати 28.02.19

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Ивануса С.Я., Иванов А.М., Лазуткин М.В., Чеботарь А.В.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОВРЕМЕННОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

ФГБВОУВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, г. Санкт-Петербург, Россия.

Проведен систематический поиск литературных источников в реферативных базах данных Scopus, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library, CyberLeninka, РИНЦ за 2010-2018 года. Поисковыми запросами были: острый панкреатит и осложнения, острый панкреатит и диагностика, острый панкреатит и диагностика и осложнения, острый панкреатит и осложнения и сепсис. Представлены результаты поиска и анализа отобранных литературных источников. Выявлено, что применяющееся в настоящее время множество лабораторных и инструментальных методов диагностики инфекционных осложнений острого панкреатита не в полной мере отвечает запросам клинической практики. Наиболее распространенными из них являются определение в крови концентрации С-реактивного белка и прокальцитонина. При этом отмечен ряд недостатков этих методов. В последнее десятилетие в клиническую практику вводится множество новых маркеров системной инфекции. Некоторые из них исследуются в настоящее время в целях диагностики сепсиса вообще и инфекционных осложнений острого панкреатита в частности. Наиболее перспективными являются такие, как прецепсин, мид-региональный про-адреномедуллин, CD64 индекс нейтрофилов и некоторые другие.

Ключевые слова: острый панкреатит; инфекционные осложнения; сепсис; лабораторная диагностика; обзор.

Для цитирования: Ивануса С.Я., Иванов А.М., Лазуткин М.В., Чеботарь А.В. Перспективные возможности современной лабораторной диагностики инфекционных осложнений острого панкреатита (обзор). Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (3): 145-152. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-145-152>

Ivanusa S. Ya., Ivanov A. M., Lazutkin M. V., Chebotar A. V.

OPPORTUNITIES OF MODERN LABORATORY DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS COMPLICATIONS OF ACUTE PANCREATITIS (LITERATURE REVIEW)

MGBUOBA, Military-medical Academy S. M. Kirov, 194044, St. Petersburg, Russian Federation

A systematic search of literary sources in the abstract databases Scopus, Web of Science, MedLine, the Cochrane Library, CyberLeninka, RSCI for 2010-2018. The search queries were: acute pancreatitis and complications, acute pancreatitis and diagnosis, acute pancreatitis and diagnosis and complications, acute pancreatitis and complications, and sepsis. The results of search and analysis of selected literature sources are presented. It was revealed that the currently used set of laboratory and instrumental methods of diagnosis of infectious complications of acute pancreatitis does not fully meet the needs of clinical practice. The most common of them are the determination of blood concentrations of C-reactive protein and procalcitonin. At the same time, a number of disadvantages of these methods are noted. In the last decade, many new markers of systemic infection have been introduced into clinical practice. Some of them are currently being investigated in order to diagnose systemic infection in General and infectious complications of acute pancreatitis in particular. The most promising are such as presepsin, MID-regional Pro-adrenomedullin, CD64 neutrophil index and some others.

Key words: acute pancreatitis; infectious complications; sepsis; laboratory diagnostics; review.

For citation: Ivanusa S. Ya., Ivanov M. A., Lazutkin V. M., Chebotar A. V. Opportunities of modern laboratory diagnostics of infectious complications of acute pancreatitis (review). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (3): 145-152 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-145-152>

For correspondence: Chebotar A. V., associate at the Department of General surgery; e-mail: chebotar.anton@yandex.ru

Information about authors:

Maxim Lazutkin, <https://orcid.org/0000-0003-4971-7734>

Anton V. Chebotar, <https://orcid.org/0000-0001-6996-4471>

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 28.02.2019
Accepted 04.03.2019

Введение. Острый панкреатит (ОП) широко распространен среди населения развитых стран. По частоте причин госпитализаций в неотложной хирургии это заболевание находится на одном из ведущих мест, уступая только острому аппендициту и острому холециститу [1, 2]. До 30% случаев заболевание протекает в тяжелой форме, летальность при которой достигает 30%, а при развитии инфекционных осложнений – 85%

[1–6]. По данным за 2012 год в США затраты на стационарное лечение больных с ОП превысили 2,5 миллиарда долларов [7]. Наибольшее число неблагоприятных исходов наблюдается в стадию гнойно-септических осложнений [4, 8, 9].

Своевременная и точная диагностика инфекционных осложнений острого панкреатита является актуальной и сложной проблемой. Диагностические ошибки приводят к выбору неверной тактики хирургического лечения, возникновению и прогрессированию сепсиса и росту летальности в целом [10–12].

Для корреспонденции: Чеботарь Антон Викторович, адъюнкт при кафедре общей хирургии; e-mail: chebotar.anton@yandex.ru

Вашему вниманию предлагается обзор современных методов диагностики и прогнозирования панкреатогенной инфекции, как частного случая абдоминального сепсиса.

Материал и методы. Проведен систематический анализ литературных источников в отечественных и зарубежных базах данных за 2010-2018 года. Были сформулированы следующие поисковые запросы: острый панкреатит и осложнения, острый панкреатит и диагностика, острый панкреатит и диагностика и осложнения, острый панкреатит и осложнения и сепсис. Представлены результаты анализа отобранных источников.

Гуморальные маркеры инфекционных осложнений острого панкреатита. К наиболее широко применяемым для диагностики инфекционных осложнений острого панкреатита лабораторным тестам относятся С-реактивный белок (СРБ) и прокальцитониновый тест (ПКТ).

С-реактивный белок используется в клинической практике примерно с 1930 г. СРБ является острофазным протеином, концентрация которого в плазме крови возрастает при воспалении. Хотя СРБ является неспецифическим маркером воспаления, в некоторых работах указывается на возможность использования его для верификации инфицирования панкреонекроза и диагностики абдоминального сепсиса. В исследовании С.В. Михайлуова и соавт. [13] отмечается, что повышение СРБ в сыворотке крови более 96 мг/мл на 2-й неделе от начала заболевания можно считать одним из ранних диагностических маркеров развития инфекционного процесса в области деструкции поджелудочной железы. При этих показателях уровня СРБ метод обладает следующими характеристиками: чувствительность – 53,3%, специфичность – 80%. Несмотря на простоту и относительную дешевизну, метод имеет ряд существенных недостатков: длительная индукция роста концентрации СРБ в плазме крови, повышенное содержание СРБ в течение длительного времени после санации очага инфекции, концентрация СРБ повышается не пропорционально тяжести инфекции и может значительно увеличиваться при «малых» инфекционных процессах и воспалительных заболеваниях неинфекционной природы [14, 15].

Прокальцитониновый тест в настоящее время считается оптимальным маркером для диагностики инфекционных осложнений острого панкреатита. У больных с хроническими воспалительными заболеваниями (в том числе и аутоиммунными), вирусными инфекциями, локализованными бактериальными инфекциями уровень прокальцитонина составляет менее 0,5 нг/мл. Системная воспалительная реакция бактериальной этиологии умеренной интенсивности, травмы, ожоги сопровождаются повышением концентрации прокальцитонина в пределах 0,5-2 нг/мл. При тяжелой бактериальной инфекции, сепсисе, инфекционно-токсическом шоке концентрация прокальцитонина в плазме крови превышает 2 нг/мл и может достигать высоких значений – до 100 нг/мл и более [15].

Прокальцитониновый тест, по мнению ряда авторов, не только не уступает в точности методу тонкоигльной пункции-аспирации, но и положительно отлич-

чается быстротой исполнения, малой инвазивностью, безопасностью, простотой. Кроме того, мониторинг прокальцитонина способствует более точному администрированию введения антибактериальных препаратов. Признаком инфицирования панкреонекроза считают повышение концентрации прокальцитонина более 1,8 нг/мл, обнаруживаемое в течение двух дней подряд. Чувствительность метода варьирует от 84,7% до 95%, специфичность от 86,7% до 94% [16].

Однако в процессе использования ПКТ, как маркера хирургической и панкреатогенной инфекции, выявлен целый ряд состояний, влияющих на уровень данного маркера. В некоторых работах показано, что уровень прокальцитонина может повышаться при массовой гибели клеток. К таким состояниям относятся: травмы, ожоги и обширные хирургические вмешательства, некоторые онкологические процессы, заболевания легких, инвазии грибковыми инфекциями, острый коронарный синдром и длительная гипоперфузия тканей. В некоторых работах указывается, что повышение прокальцитонина при генерализации инфекции и развитии сепсиса часто происходит со значительной задержкой, что ведет к ложноотрицательным результатам, так называемый феномен «серой зоны» [15, 17].

Хорошей прогностической возможностью развития инфекционных осложнений обладают интерлейкины – IL-6, IL-8, IL-10 и др. В 2015 г. D.W. Jekarl и соавт. [18] провели оценку 13 цитокинов у больных с ССВР, из них 36 больных с сепсисом. В результате исследования авторы заключили, что к наиболее информативным маркерам относятся СРБ, ПКТ и ИЛ-6, а остальные цитокины не коррелировали с диагнозом сепсиса. В других исследованиях отмечается, что использование цитокинов ограничено значительной стоимостью анализа, а так же отсутствием многоцентровых исследований, доказывающих эффективность метода [12, 15, 19].

Одним из новых маркеров системной хирургической инфекции является пресепсин (P-SEP). P-SEP, или sCD14-ST, — высокоэффективный маркер сепсиса, который был открыт около 15 лет назад. Существуют 2 формы CD14: мембранная (mCD14) и растворимая (sCD14). Комплекс LPS—LPBP—sCD14 циркулирует в крови, где расщепляется катепсином D и другими протеазами плазмы с высвобождением N-терминального фрагмента молекулярной массой 13 кДа — молекулы sCD14-subtype (sCD14-ST), названной пресепсин. Пресепсин вырабатывается моноцитами в ответ на активацию фагоцитозом. Данному маркеру в последнее десятилетие уделяется особое внимание, так как он показал высокую чувствительность, специфичность и малое время реакции для появления в крови [20, 21]. Пресепсин – циркулирующий белок, маркер фагоцитоза. P-SEP – маркер реакции врожденного иммунитета на бактериальную инфекцию, маркер начальной фазы системной инфекции. Циркулирующий P-SEP – свидетель активации моноцитов-макрофагов в ответ на присутствие патогенов (бактерий, грибов) [22].

Пресепсин более чувствителен и специфичен по сравнению с другими маркерами системного воспа-

лительного ответа инфекционного генеза. Концентрация P-SEP в плазме значительно выше у больных с признаками хирургического сепсиса, чем у неинфицированных [21, 22]. В 2011 г. Т. Shozushima и соавт. [23] опубликовали результаты исследования уровня пресепсина у больных ССВР без сепсиса, больных с локальным воспалением, с сепсисом и тяжелым сепсисом. Концентрация P-SEP составляла соответственно: $333,5 \pm 130,6$ пг/мл в группе больных с СВР без сепсиса, $721,0 \pm 611,3$ пг/мл в группе с ограниченной инфекцией, $817,9 \pm 572,7$ пг/мл в септической группе и $1992,9 \pm 1509,2$ пг/мл в группе с тяжелым сепсисом. Концентрация данного маркера возрастала последовательно. Динамика характеризовалась быстрым появлением и ростом до ИЛ-6, ПКТ и СРБ. Уровень P-SEP коррелировал со шкалами APACHE II и SOFA. В других исследованиях приводятся подобные данные [24–28]. При пороговом значении концентрации пресепсина 399 пг/мл чувствительность диагностики сепсиса составляла 80,3 %, а специфичность — 78,5%, в то время как при пороговом значении 600 пг/мл чувствительность диагностики сепсиса составила 87,8 %, специфичность — 81,4 %, позитивная прогностическая величина — 88,6 %, негативная прогностическая величина — 80,3 % по сравнению с чувствительностью прокальцитонинового теста — 89,9 %, ИЛ-6 — 88,9 % и культуры крови — всего 35,4 % [22]. Исследования так же показали возможность мониторинга тяжести сепсиса и эффективности антибактериальной терапии на основании вычисления дельты уровня пресепсина при поступлении, в процессе лечения и наблюдения за больным [29]. Также установлено, что ПСП имеет 100% чувствительность к инфекции, подтвержденной гемокультурами [30, 31]. При сравнении динамики P-SEP, ПКТ, СРБ, ИЛ-6 и баллов по шкале SOFA выявлено, что только уровни P-SEP отражают реальную динамику тяжести сепсиса и коррелирует со значениями SOFA [25, 27]. Установлено, что при купировании клинических симптомов сепсиса динамика P-SEP (в отличие от динамики прокальцитонина) прогнозирует рецидив заболевания [32, 33].

Результаты исследований позволяют считать, что пресепсин является перспективным маркером в диагностике сепсиса. Однако, в исследованной литературе нет данных, посвященных определению пресепсина для дифференциальной диагностики инфекционных осложнений острого панкреатита.

Мид-региональный про-адреномедуллин (Mid-regional pro-adrenomedullin, MR-proADM) – прогормон адреномедулина – вазодилаторного пептида, синтезируемого разными тканями. MR-proADM – маркер активации нейрогуморального механизма иммунного ответа. Повышение MR-proADM происходит при разных патологиях: сердечной недостаточности, онкологических процессах, при инфекциях и связано с тяжестью данной патологии. MR-proADM участвует в защите от бактериальной инфекции, может индуцировать гипердинамическое кровообращение на ранних стадиях сепсиса и его прогрессирования к септическому шоку. Предполагается, что MR-proADM может быть предиктором тяжести и исходов сепсиса. Совместное измерение MR-proADM и ПКТ повыша-

ет точность диагностики и прогноза. Повышенный MR-proADM свидетельствует о развитии тяжелых осложнений у инфицированных пациентов и указывает на необходимость их раннего перевода в ОРИТ. Установлено, что MR-proADM коррелирует со шкалами APACHE II и SOFA, а так же уровень его более 2,5 нмоль/л при поступлении является предиктором высокой летальности [17, 34, 35].

sTREM-1: растворимый сывороточный триггерный рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках-1 (Soluble serum triggering receptor expressed on myeloid cells-1). Рецептор TREM-1 расположен на поверхности миелоидных клеток (нейтрофилы, зрелые моноциты/макрофаги). Синтез sTREM-1 значительно повышается в присутствии лигандов – PAMP (pathogen-associated molecular pattern) – компонентов бактерий и грибов. При связывании TREM-1 с лигандами активируется сигнальный путь воспаления и от TREM-1 отщепляется фрагмент – sTREM-1, который выходит в системный кровоток, а так же обнаруживается в моче, спинномозговой жидкости и в других биологических средах. Показано, что sTREM-1 повышается при сепсисе, пневмонии, септическом артрите, менингите, перитоните и др. инфекциях. При этом уровни sTREM-1 повышаются независимо от тяжести патологии [36]. Однако отмечено, что TREM-1 является маркером не инфекционных воспалительных процессов, когда активация его происходит при связывании с лигандами, ассоциированными с тяжелыми не инфекционными острыми и хроническими патологиями – DAMP – damage-associated molecular pattern [37].

Дисфункция эндотелия как признак тяжести острого панкреатита. Острый панкреатит, протекая в первую фазу своего развития как неинфекционная СВР, сопровождается дисфункцией со стороны органов и систем, в первую очередь со стороны легких, почек, печени, эндотелия.

Функциональные расстройства эндотелия считаются критическим моментом в развитии гипотензии при системной воспалительной реакции. По степени нарушений функций эндотелия можно судить о раннем развитии СВР и ее осложнений при остром панкреатите [1]. В следовании Е.Б. Загородских и соавт. [38] показана эффективность использования маркеров дисфункции эндотелия в оценке динамики лечения и прогнозе осложнений у больных с острым панкреатитом тяжелой степени. В качестве маркеров использовались васкулоэндотелиальный фактор роста (ВЭФР) и количество десквамированных эндотелиоцитов в сыворотке крови. Авторы выявили, что маркеры дисфункции эндотелия достоверно повышены у больных ОП по сравнению со здоровыми, в частности, уровень ВЭФР составил $517,2 \pm 619,3$ пг/мл ($p = 0,0002$). У больных в фазе гнойно-септических осложнений выявлена обратная корреляция между тяжестью сепсиса и уровнем ВЭФР плазмы крови: $r = -0,38$ (95 % ДИ $-0,372$ и $-0,387$, $p = 0,003$). Маркер повреждения эндотелия – ВЭФР – при динамическом исследовании применим для прогнозирования развития септических осложнений при ОП: снижение уровня ВЭФР сыворотки крови или отсутствие его повышения сви-

детельствует об утяжелении СВР, неэффективности лечебных мероприятий и имеет неблагоприятное прогностическое значение. Данных о чувствительности и специфичности данной методики не приводится.

В 2014 г. Д.М. Овсяник [39] представил результаты проспективного исследования показателей эндотелиальной дисфункции – количества циркулирующих эндотелиальных клеток и концентрации стабильных продуктов деградации монооксида азота – в крови 92 пациентов с различными формами острого панкреатита. По результатам исследования автор заключил, что при остром панкреатите легкой степени тяжести наблюдается статистически значимое увеличение количества циркулирующих эндотелиальных клеток и уровня нитратов/нитритов в крови в 1,5 раза по сравнению с показателями здоровых лиц ($p=0,0051$; $p=0,0206$). У пациентов с признаками деструкции поджелудочной железы и парапанкреатической клетчатки явления эндотелиальной дисфункции более выражены, однако при стерильном течении заболевания в процессе лечения имели тенденцию к регрессу. При развитии инфекционных осложнений отмечалась отрицательная динамика: рост количества циркулирующих эндотелиальных клеток в крови. Прогностическим критерием инфицирования по данным автора является уровень нитратов/нитритов в первую неделю госпитализации – >36 мкМ/л (чувствительность – 81,8%, специфичность – 60,3%). По данным исследования диагностическим критерием инфицирования зон деструкции является наличие в крови пациента во второй фазе течения заболевания 39 и более циркулирующих эндотелиальных клеток в 100 мкл. плазмы (чувствительность – 84%, специфичность – 86%).

Клеточные маркеры системной инфекции в диагностике инфекционных осложнений острого панкреатита. Поверхностные антигены лимфоцитов (Cluster of Differentiation – CD – кластеры дифференцировки) — это молекулы, которые действуют как рецепторы или лиганды, обеспечивая клеточную реакцию в ответ на стимуляцию, например, провоспалительными цитокинами. Из этой группы антигенов наибольший научный интерес в оценке системной инфекции представляет CD64, поскольку является рецепторным гликопротеином поверхности нейтрофилов. Neutrophil CD64 — мембранный белок, гликопротеин, Fc-рецептор к мономерным иммуноглобулинам изотипа IgG с высокой аффинностью. CD64 постоянно представлен только на мембранах макрофагов и моноцитов. CD64 может экспрессироваться на гранулоцитах после их активации цитокинами, такими как интерферон-гамма и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор [40, 41]. Появление и увеличение экспрессии CD64 на поверхности нейтрофилов является признаком инфекции и сепсиса, что убедительно показано во многих исследованиях. Мета-анализы по клиническому применению данного маркера продемонстрировали высокие уровни его чувствительности и специфичности – 85 % и 76 % соответственно [41, 42]. В некоторых исследованиях приводятся данные о корреляции CD64-индекса с летальностью больных с инфекцией и сепсисом: высокая степень экспрессии связывается с более высокими

цифрами смертности [43, 44]. Характерной особенностью CD64-индекса нейтрофилов является то, что его появление и нарастание происходит до проявления клинических признаков инфекции [40]. Это может облегчить диагностику инфекционных осложнений острого панкреатита, сделать ее более точной и, что еще важнее, опережающей.

Молекулы главного комплекса гистосовместимости II типа – HLA-DR – другой клеточный маркер системного воспаления, активно изучаемый в последнее время. HLA-DR-рецептор принимает участие в презентации антигенов [45]. Моноциты здоровых людей экспрессируют на своей поверхности молекулы HLA-DR в высокой плотности. Однако моноциты с уменьшенной или отсутствующей экспрессией молекул HLA-DR не могут выполнять свою антигенпредставляющую функцию и не обладают способностью продуцировать воспалительные медиаторы в ответ на соответствующие стимулы. С учетом того, что сепсис с патогенетической точки зрения рассматривается как дисбаланс, а чаще всего угнетение врожденного иммунитета, оценка HLA-DR как маркера иммунодефицита при сепсисе представляет определенный интерес. В исследованиях выявлено, что критическое снижение экспрессии HLA-DR на моноцитах менее 42% является достоверным признаком системной инфекции. Высокий уровень HLA-DR нейтрофилов и низкий уровень HLA-DR моноцитов прежде всего связывают с бактериемией и внеклеточным ацидозом, которые развиваются при различных воспалительных процессах [46]. В работе В.А. Лазанович и соавт. [47] проведен анализ уровня экспрессии HLA-DR на моноцитах периферической крови у септических больных. Выявлена корреляция его низкого уровня на 5 и 10 сут с неблагоприятными исходами заболевания. Это совпадает с ранее опубликованными данными, что уменьшение экспрессии данного маркера на клетках миелоидного ряда у пациентов в критических состояниях (сепсис, травма, послеоперационные состояния, ожоги, панкреатит) является предиктором развития тяжелых вторичных инфекционных осложнений и неблагоприятного исхода септического процесса [46, 48]. В работе J.E. Wu и соавт. [49] не было выявлено различий между выжившими и умершими больными с сепсисом с использованием 30% cut-off критерия экспрессии HLA-DR на моноцитах. Однако они отмечают, что 4,8% дельта уровня HLA-DR в первые 3 суток после поступления позволила прогнозировать летальность с чувствительностью 89% и специфичностью 93,7%. В ретроспективном исследовании H. Trimmel и соавт. [50] не было выявлено конкретного значения экспрессии HLA-DR, коррелирующего с уровнем летальности у септических пациентов. Таким образом, имеющихся в настоящее время данных недостаточно для определения чувствительности и специфичности данной методики.

Физико-химические методы диагностики острого панкреатита и его инфекционных осложнений. Рассматривая сепсис с позиций иммунного дисбаланса, интересным представляется оценка активности иммунной системы не по прямым показателям, а че-

рез призму активации тех или иных биохимических процессов иммунокомпетентных клеток. Попытку такой оценки предприняли С.С. Дунаевская и соавт. [51], проведя изучение активации лимфоцитов по уровню продукции ими активных форм кислорода (АФК). Для этого применен метод люминол зависимой хемилюминисценции. В результате выделены 3 типа хемилюминисценции – гипоксический, нормоксический и гипероксический, причем выявлена связь более тяжелого течения заболевания с гипоксическим типом хемилюминисцентного ответа.

Еще более широко активированную хемилюминисценцию для диагностики состояния иммунитета и клеточного энергообмена у больных с абдоминальным сепсисом применили А.А. Савченко и соавт. [52, 53]. По их данным у больных с благоприятным исходом заболевания повышается максимальная интенсивность и снижена величина индекса активации люцигенинзависимой спонтанной хемилюминисценции нейтрофильных гранулоцитов. Независимо от исхода заболевания у больных повышаются индекс активации и максимумы интенсивности люминолзависимой спонтанной и химозаниндуцированной хемилюминисценции. При неблагоприятном исходе заболевания в нейтрофилах повышена активность НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы и анаэробной реакции лактатдегидрогеназы. Вне зависимости от исхода заболевания в нейтрофильных гранулоцитах больных снижена активность аэробной реакции лактатдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы, но повышены уровни активности НАДН-зависимой реакции малатдегидрогеназы, НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы.

В исследовании Ю.С. Винник и соавт. [54] посвященном этому же вопросу, установлено, что при легкой степени острого панкреатита происходит активация процессов перекисного окисления липидов, о чем свидетельствует увеличение генерации активных форм кислорода. При среднетяжелом остром панкреатите происходили изменения в хемилюминисцентной реакции, характеризующие ее как гипероксическую. Определяли повышение интенсивности хемилюминисценции в 9,51 раза. Тяжелая форма заболевания характеризовалась снижением генерации активных форм кислорода на фоне выраженного эндотоксикоза и характеризовала хемилюминисцентную реакцию как гипоксическую: регистрировалось снижение максимального значения хемилюминисценции в 9,3 раза.

Проведенные исследования подтвердили, что изменения хемилюминисцентной реакции являются дополнительными критериями оценки тяжести острого панкреатита и его инфекционных осложнений. При легком и средне-тяжелом остром панкреатите преобладают процессы гиперпродукции активных форм кислорода. Тяжелый острый панкреатит и развитие панкреатогенной инфекции характеризуются снижением образования активных форм кислорода, что проявляется гипоксическим типом хемилюминисцентной реакции как проявлением угнетения иммунного ответа.

Бактериологический анализ. Важным вопросом в диагностике инфекционных осложнений острого панкреатита остается получение результатов бактериологического исследования аспирата, полученного при тонкоигольной пункции. На сегодняшний день тонкоигольная пункция-аспирация жидкостных образований поджелудочной железы и парапанкреатической клетчатки с целью подтверждения инфицирования считается общепринятой методикой в диагностике инфекционных осложнений острого панкреатита. Показанием для процедуры служит основанное на клинических и лабораторных данных подозрение на развитие панкреатической инфекции. Пункцию проводят под УЗИ или КТ контролем с последующим бактериологическим исследованием материала. Признаком инфицирования считается содержание в пунктате 30-40 и выше лейкоцитов в поле зрения, нейтрофилов больше 50%, рост микрофлоры. Чувствительность метода по данным разных авторов составляет 91-96%, специфичность 72-88% [1, 4, 9, 55].

Важно, что в результате пункции появляется возможность не только констатировать факт инфицирования, но и провести полноценное бактериологическое исследование пунктата. Среди недостатков процедуры отмечаются длительность проведения бактериологического исследования, инвазивность процедуры и риск экзогенного инфицирования, риск повреждения внутренних органов и др. [1, 8, 12, 14].

Ускорить получение информации о возбудителе позволяют новые методики бактериологического анализа: real-time ПЦР, газовая хроматография – масс-спектрометрия (ГХ-МС) и MALDI-TOF спектрометрия.

Метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии микробных маркеров разработан в России и с 1991 г. широко используется в различных областях медицины, экологии и биотехнологии [56]. В основе метода лежит высокоточное определение молекулярных маркеров микроорганизмов из числа их клеточных липидов – высших жирных кислот, альдегидов, спиртов и стеролов в анализируемой пробе. Метод позволяет одновременно измерять более сотни микробных маркеров непосредственно в анализируемом материале. Материалом может служить любая биологическая жидкость или ткань без предварительного посева на питательных средах. Метод автоматизирован, позволяет определить концентрацию более 50 микроорганизмов в образце уже через три часа после его поступления в лабораторию [57]. Опубликованы ряд исследований по диагностике хирургических инфекций методом ГХ-МС. Исследователи отмечают быстроту, удобство и точность полученных результатов в сравнении с традиционными культуральными методами [58, 59, 60].

MALDI-TOF (от англ. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time-Of-Flight*) – метод детекции культуры на основе идентификации возбудителя по масс-спектрометрическому (МС) профилю его рибосомальных белков, полученному по технологии матрица-активированной лазерной десорб-

ции/ионизации протеинов образца [40, 61]. МС-идентификация микробов в гемокультурах была успешно апробирована в диагностике бактериемий как у взрослых пациентов, так и у детей [62, 63]. Метод так же полностью автоматизирован, не требует сложной пробоподготовки, в качестве образца используется периферическая кровь. В специализированной литературе метод носит название «протеомная дактилоскопия», так как спектр рибосомальных белков каждого микроорганизма строго индивидуален, подобно отпечаткам пальцев у человека. Субтипирование микроорганизмов происходит по эталонным образцам электронной библиотеки, насчитывающей на данный момент более 6000 видов и постоянно обновляющейся [40, 61, 64, 65]. В работе И.В. Чеботарь и соавт. [62] по выявлению возбудителя в гемокультуре у детей, подозрительных на сепсис, были получены следующие результаты: для грамотрицательных бактерий и грибов результаты идентификации совпадали в 100% случаев. Моногемокультуры с грампозитивными возбудителями демонстрировали неполное (92,6%), но достаточно высокое совпадение (каппа Коэна — 0,89). Таким образом, авторы подтвердили возможность эффективного применения МС-идентификации возбудителей бактериемий, что подтверждается результатами других исследователей [65–67].

Определенный интерес в плане определения состава микрофлоры у больных с инфекционными осложнениями панкреатита представляет метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время предложены различные модификации (ПЦР), позволяющие существенно повысить эффективность анализа. Молекулярно-генетический анализ обладает наибольшей чувствительностью из всех известных методов экспресс-индикации. Применение традиционных флуоресцентных меток для обнаружения биоагентов с помощью ДНК-зондов, как правило, позволяет выявить 10^2 – 10^3 клеток в пробе. Амплификация генетического материала методом ПЦР нуклеиновых кислот снижает этот порог до единичных клеток. Развитие методологии ПЦР в настоящее время рассматривается как одно из важнейших направлений для создания чувствительных и специфичных методов индикации и идентификации возбудителей, не имеющих равных среди методов лабораторной диагностики [40].

В целом, можно заключить, что арсенал методов диагностики тяжести острого панкреатита и его инфекционных осложнений достаточно широк. Некоторые из них уже широко применяются в клинической практике, другие только находятся в стадии разработки и апробации. Применение третьих зависит от наличия редкой дорогостоящей аппаратуры. Все это позволяет вести поиск и разработку универсальной методики или алгоритма диагностики, прогнозирования, оценки тяжести в динамике течения острого панкреатита и его инфекционных осложнений.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4 – 7, 11, 15 – 18, 20 – 23, 25 – 37, 41 – 44, 46, 48 – 50, 63, 65, 67 – 68 см. REFERENCES)

1. Ермолов А.С., Иванов П.А., Благовестнов Д.А., Гришин А.А. Диагностика и лечение острого панкреатита. М.: ВИДАР; 2013.
2. Савельев В.С., Гельфанд Б.Р., Фидимонов М.И. Деструктивный панкреатит. Доказательные методы диагностики и лечения. Методические рекомендации. М.: РАСХИ; 2008.
3. Зубарев П.Н., Косачев И.Д., Паскарь С.В. Причины летальных исходов при остром деструктивном панкреатите. *Вестник СПбГУ. Сер. 11, медицина.* 2009; 4: 161-8.
8. Недашковский Э.В., ред. Острый панкреатит: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009.
9. Ромашенко П.Н., Струков Е.Ю. Острый панкреатит. Аспекты диагностики и лечения. СПб.: ЭЛБИ-СПб; 2013.
10. Овсяник Д.М., Фомин А.В., Становенко В.В. Ранние признаки инфицирования панкреонекроза: *Материалы пленума правления ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ.* Самара; 2015.
12. Лысенко М.В., Девятов А.С., Урсов С.В., Пасько В.Г., Грицок А.М. Острый панкреатит. Дифференцированная лечебно-диагностическая тактика. М.: Литерра; 2010.
13. Михайлулов С.В., Моисеев Е.В., Смирнова Н.А., Богданова Л.С., Воробьева Е.А., Эштреков М.С. Лабораторная диагностика инфицированного панкреонекроза. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2010; 11: 3-7.
14. Литвин А. А. Инфицированный панкреонекроз. Москва: Интеграция; 2011.
19. Звягин А.А., Демидова В.С., Смирнов Г.В. Биологические маркеры в диагностике и лечении сепсиса. *Раны и раневая инфекция. Журнал им. проф. Б.М. Костюченко.* 2016; 3(3): 19-23.
24. Вельков В.В. Использование биомаркера пресепсин для ранней диагностики сепсиса. *Раны и раневые инфекции. Журнал имени профессора Б.М. Костюченко.* 2015; 2(1): 54-7.
38. Загородских Е.Б., Черкасов В.А., Щёктова А.П. Маркеры эндотелиальной дисфункции и их прогностическое значение при остром панкреатите тяжелого течения. *Медицинские науки. Фундаментальные исследования.* 2013; 9: 355-61.
39. Овсяник Д.М. Диагностика инфицированного панкреонекроза на основании оценки показателей эндотелиальной дисфункции. *Новости хирургии.* 2014; 22(4): 428-35.
40. Иванов А.М., Жданов К.В., Криворучко А.Б., Кузин А.А. Перспективные технологии и исследования в области медицинской лабораторной диагностики. *Военно-медицинский журнал.* 2013; 334(6): 54-7.
45. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
47. Лазанович В.А., Маркелова Е.В., Смирнов Г.А., Смолина Т.П. Клиническая значимость экспрессии Toll2, Toll4, CD14, HLA-DR на моноцитах у пациентов с сепсисом. *Медицинская иммунология.* 2015; 17(3): 221-8.
51. Дунаевская С.С., Дябкин Е.В. Активные формы кислорода и хемилюминисценция при остром панкреатите. *Сибирский медицинский журнал.* 2010; 3: 38-40.
52. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминисцентная и энзиматическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания. *Вестник РАМН.* 2014; 5(6): 23–8.
53. Савченко А.А., Черданцев Д.В., Первова О.В., Гвоздев И.И., Борисов А.Г. Клиническое состояние и хемилюминисцентная активность нейтрофильных гранулоцитов больных распространенным гнойным перитонитом в динамике послеоперационного периода. *Бюллетень сибирской медицины.* 2014; 13(6): 10–9.
54. Винник Ю.С., Дунаевская С.С., Антифриева Д.А. Генерация активных форм кислорода и состояние иммунитета при тяжелом остром панкреатите. *Ургентная медицина: актуальные вопросы и тенденции развития. Материалы международной научно-практической конференции.* Улан-Удэ: БурГУ. 2017; 10-9.
55. Паскарь С.В., Косачев И.Д., Варзин С.А. Эффективность методов ранней диагностики и оптимизация лечебной тактики при

- остром деструктивном панкреатите. *Вестник СПбГУ. Сер. 11, медицина*. 2010; 1: 83-91.
56. Осипов Г.А. Способ определения родового (видового) состава ассоциации микроорганизмов. Патент РФ № 2086642; С12N 1/00, 1/20, С12Q 1/4. Приоритет от 24 дек.1993г.
57. Осипов Г.А., Крымцева Т.А., Осипов Д.Г., Столярова О.Н. Функциональные изменения жирнокислотного состава урогенитальных жидкостей организма человека при дисбиозах. М.: Прометей; 2005.
58. Буткевич А.Ц., Чадаев А.П., Истратов В.Г., Хизриев Э.А. Газовая хроматография в диагностике и прогнозе течения деструктивного панкреатита. *Клиническая медицина*. 2007; 3: 43–6.
59. Гагуа А. К., Иваненков И.М., Терехов А.Н. Применение газожидкостной хроматографии для диагностики анаэробной неклостридиальной инфекции при инфицированном панкреонекрозе. *Вестник Ивановской медицинской академии*. 2014; 19(1): 44-7.
60. Мионов А.Ю. Газовая хроматография и масс-спектрометрия в диагностике анаэробов. *Альманах клинической медицины*. 2012; 26: 45-51.
61. Маянский Н.А., Калакуцкая А.Н., Мотузова О.В., Ломинадзе Г.Г., Крыжановская О.А., Катосова Л.К. MALDI-TOF масс-спектрометрия в рутинной работе микробиологической лаборатории. *Вопросы диагностики в педиатрии*. 2011; 3(5): 20–5.
62. Чеботарь И.В., Пономаренко О.А., Лазарева А.В., Карасева О.В., Горелик А.Л., Бочарова Ю.А. Использование MALDI-TOF-технологии для идентификации возбудителей септических состояний в педиатрической практике. *Клиническая медицина*. 2015; 7(2): 68-74.
64. Ломинадзе Г.Г., Семенова Е.А., Мотузова О.В., Калакуцкая А.Н., Лазарева А.В. Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентификации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис. *Лабораторная диагностика; Спецвыпуск № 4: «Лаборатория ЛПУ»*. 2014: 17-20.
66. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р., Бурменская О.В., Нешпа О.С., Никитина И.В., Любасовская Л.А. Использование методов MALDI-TOF масс-спектрометрии и количественной ПЦР для быстрой диагностики септических состояний. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014; 16(1): 4–9.
12. Lysenko M.V., Devyatov A.S., Ursov S.V., Pas'ko V.G., Gricyuk A.M. Acute pancreatitis. Differentiated diagnostic and treatment tactics. Moscow : Literra; 2010. (in Russian)
13. Mihajlusov S.V., Moiseenkova E.V., Smirnova N.A., Bogdanova L.C., Vorob'eva E.A., EHshtrikov M.S. Laboratory diagnosis of infected pancreatic necrosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; 11: 3-7. (in Russian)
14. Litvin A. A. Infected pancreatic necrosis. Moscow : Integratsiya; 2011. (in Russian)
15. Lipman J. An update on C-reactive protein for intensivists. *Anaesth. Intensive Care*. 2009; 37: 234-41.
16. Schuetz P., Balk R, Briel M. Economic evaluation of procalcitonin-guided antibiotic therapy in acute respiratory infections: a US health system perspective. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53: 583–92.
17. Angeletti S. Ottaviani R., Lanotte M., Pedicino L. Procalcitonin and mid-regional pro-adrenomedullin as promising markers for sepsis diagnosis and prognosis. *APMIS*. 2015; 123(9): 740-8.
18. Jekarl D.W., Kim J.Y., Lee S., Kim M., Kim Y., Han K. Diagnosis and evaluation of severity of sepsis via the use of biomarkers and profiles of 13 cytokines: a multiplex analysis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53(4): 575-81.
19. Zvyagin A.A., Demidova V.S., Smirnov G.V. Biological markers in the diagnosis and treatment of sepsis. *Rany i ranevaya infektsiya. Zhurnal imeni prof. B.M. Kostyuchenka*. 2016; 3(3): 19-23. (in Russian)
20. Arai Y., Mizugishi K., Nonomura K., Naitoh K., Takaori-Kondo A., Yamashita K. Phagocytosis by human monocytes is required for the secretion of Presepsin. *J. Infect. Chemother.* 2015; 8: 564-9.
21. Pierrakos C., Vincent J.L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit. Care*. 2010; 14(1): 15.
22. Chenevier-Gobeaux C., Borderie D., Weiss N. Presepsin (sCD14-ST), an innate immune response marker in sepsis. *Clin. Chim. Acta*. 2015; 450: 97-103.
23. Shozushima T., Takahashi G., Matsumoto N., Kojika M., Okamura Y., Endo S. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *J. Infect. Chemother.* 2011; 17(6): 764–9.
24. Vel'kov V.V. Use of biomarker presepsin for early diagnosis of sepsis. *Rany i ranevye infekcii. Zhurnal imeni professora B.M. Kostyuchyonka*. 2015; 2(1): 54-7. (in Russian)
25. Masson S., Caironi P., Spanuth E., Thomae R., Panigada M., Sanguigni G. Presepsin (soluble CD14 subtype) and procalcitonin levels for mortality prediction in sepsis: data from the Albumin Italian Outcome Sepsis trial. *Crit. Care*. 2014; 18(1): 6.
26. Chenevier-Gobeaux C., Bardet V., Poupet H. Presepsin (sCD14-ST) secretion and kinetics by peripheral blood mononuclear cells and monocytic THP-1 cell line. *Clin. Chim. Acta*. 2016; 74(1): 93-7.
27. Kojika M., Takahashi G., Matsumoto N. Serum levels of soluble CD14 subtype reflect the APACHE II and SOFA scores. *Med. Postgrad.* 2010; 48: 46-50.
28. Spanuth E., Ebel H., Ivandic B., Werdan K. Diagnostic and prognostic value of presepsin (soluble CD14 subtype) in emergency patients with early sepsis using the new assay PATHFAST Presepsin. 21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC World Lab. Berlin : *Euro Med Lab*; 2011.
29. Endo S., Suzuki Y., Takahashi G., Shozushima T., Ishikura H., Murai A. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *J. Infect. Chemother.* 2012; 18(6): 891–7.
30. Endo S., Takahashi G., Suzuki Y., Shozushima T., Ishikura H., Murai A. Presepsin as a powerful monitoring tool for the prognosis and treatment of sepsis: A multicenter prospective study. *J. Infect. Chemother.* 2013; 1: 34-41.
31. Novelli G., Morabito V., Ferretti G., Pugliese F., Ruberto F., Venuta F. et al. Pathfast Presepsin Assay for Early Diagnosis of Bacterial Infections in Surgical Patients: Preliminary Study. *Transplant Proc.* 2013; 45(7): 2750-3.
32. Takahashi G., Shibata S., Ishikura H. Presepsin in the prognosis of infectious diseases and diagnosis of infectious disseminated intravascular coagulation: A prospective, multicentre, observational study. *Eur. J. Anaesthesiol.* 2015; 32 (3): 199-206.

33. Sargentini V., Ceccarelli G., D'Alessandro M. Presepsin as a potential marker for bacterial infection relapse in critical care patients. A preliminary study. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53(4): 567-73.
34. Andaluz-Ojeda D., Bryant Nguyen H., Meunier-Beillard N. Superior accuracy of mid-regional proadrenomedullin for mortality prediction in sepsis with varying levels of illness severity. *Ann. Intensive Care.* 2017; 7(15).
35. Valenzuela-Sánchez F., Valenzuela-Méndez B., Rodríguez-Gutiérrez J.F., Estella-García Á., González-García M.Á. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin the biomarker of organ failure. *Ann. Trans. Med.* 2016; 4(17): 329-40.
36. Brenner T., Uhle F., Fleming T. Soluble TREM-1 as a diagnostic and prognostic biomarker in patients with septic shock: an observational clinical study. *Biomarkers.* 2017; 22(1): 63-9.
37. Tammaro A., Derive M., Gibot S. TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol. Ther.* 2017; 177: 81-95.
38. Zagorodskikh E.B., Cherkasov V.A., Shchyokotova A.P. Markers of endothelial dysfunction and their prognostic value in acute pancreatitis of severe course. *Meditsinskie nauki. Fundamental'nye issledovaniya.* 2013; 9: 355-61. (in Russian)
39. Ovsyanik D.M. Diagnosis of infected pancreatic necrosis based on the evaluation of indicators of endothelial dysfunction. *Novosti khirurgii.* 2014; 22(4): 428-35. (in Russian)
40. Ivanov A.M., Zhdanov K.V., Krivoruchko A.B., Kuzin A.A. Promising technologies and research in the field of medical laboratory diagnostics. *Voенно-meditsinskiy zhurnal.* 2013; 334(6): 54-7. (in Russian)
41. Cid J., Aguinaco R., Sánchez R., García-Pardo G., Llorente A. Neutrophil CD64 expression as marker of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *J. Infect.* 2010; 60(5): 313-9.
42. Wang X., Li Z.Y., Zeng L., Zhang A.Q., Pan W., Gu W. Neutrophil CD64 expression as a diagnostic marker for sepsis in adult patients: a meta-analysis. *Crit. Care.* 2015; 19: 245.
43. Daryapeyma A., Pedersen G., Laxdal E., Corbascio M., Johannessen H. B., Aune S., Jonung T. Neutrophil CD64 as a Marker for Postoperative Infection: A Pilot Study. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2009; 38: 100-3.
44. Hoffmann J.J. Neutrophil CD64 as a sepsis biomarker. *Biochem. Med.* 2011; 21(3): 282-90.
45. Yarin A.A. Immunology. Moscow : GEHOTAR-Media; 2010. (in Russian)
46. Pliyev B.K., Sumarokov A.B., Buriachkovskaia L.I., Menshikov M. Extracellular acidosis promotes neutrophil transdifferentiation to MHC class II-expressing cells. *Cell Immunol.* 2011; 271(2): 214-8.
47. Lazanovich V.A., Markelova E.V., Smirnov G.A., Smolina T.P. Clinical significance of expression of Toll2, Toll4, CD14, HLA-DR on monocytes in patients with sepsis. *Meditsinskaya immunologiya.* 2015; 17(3): 221-8. (in Russian)
48. Lukaszewicz A.C., Faivre V., Payen D. Is monocyte HLA-DR expression monitoring a useful tool to predict the risk of secondary infection. *Minerva Anestesiol.* 2010; 76(9): 737-43.
49. Wu J.F., Ma J., Chen J. Changes of monocyte human leukocyte antigen-DR expression as a reliable predictor of mortality in severe sepsis. *Crit. Care.* 2011; 15(5): 220-6.
50. Trimmel H., Luschin U., Köhrer K., Anzur C., Vevera D., Spittler A. Clinical outcome of critically ill patients cannot be defined by cutoff values of monocyte human leukocyte antigen-DR expression. *Shock.* 2012; 37(2): 140-4.
51. Dunaevskaya S.S., Dyabkin E.V. Reactive oxygen species and chemiluminescence in acute pancreatitis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal.* 2010; 3: 38-40. (in Russian)
52. Savchenko A.A., Zdzitoveckij D.E.H., Borisov A.G., Luzan N.A. Chemiluminescent and enzymatic activity of neutrophil granulocytes in patients with generalized purulent peritonitis, depending on the outcome of the disease. *Vestnik Rossijskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2014; 5(6): 23-28. (in Russian)
53. Savchenko A.A., Cherdancev D.V., Pervova O.V., Gvozdev I.I., Borisov A.G. Clinical status and chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in patients with common purulent peritonitis in the dynamics of the postoperative period. *Byulleten' sibirskoy meditsiny.* 2014; 13(6): 10-9. (in Russian)
54. Vinnik YU.S., Dunaevskaya S.S., Antyufrieva D.A. The generation of reactive oxygen species and the state of immunity in severe acute pancreatitis. *Urgentnaya meditsina: aktual'nye voprosy i tendentsii razvitiya. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii.* Ulan-Udeh : BurGU. 2017; 10-9. (in Russian)
55. Paskar' S.V., Kosachev I.D., Varzin S.A. Effectiveness of early diagnostic methods and optimization of treatment tactics in acute destructive pancreatitis. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya II, meditsina.* 2010; 1: 83-91. (in Russian)
56. Osipov G.A. The method for determining the generic (species) composition of the association of microorganisms. Patent RF № 2086642; 1993. (in Russian)
57. Osipov G.A., Krymceva T.A., Osipov D.G., Stolyarova O.N. Functional changes in the fatty acid composition of urogenital body fluids in dysbiosis. Moscow : Prometej; 2005. (in Russian)
58. Butkevich A.C., Chadaev A.P., Istratov V.G., Hizriev E.H.A. Gas chromatography in the diagnosis and prognosis of destructive pancreatitis. *Klinicheskaya meditsina.* 2007; 3: 43-6. (in Russian)
59. Gagau A. K., Ivanenkov I.M., Terekhov A.N. The use of gas-liquid chromatography for the diagnosis of anaerobic non-clostridial infection with infected pancreatic necrosis. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii.* 2014; 19(1): 44-7. (in Russian)
60. Mironov A.YU. Gas chromatography and mass spectrometry in the diagnosis of anaerobes. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny.* 2012; 26: 45-51. (in Russian)
61. Mayanskij N.A., Kalakuckaya A.N., Motuzova O.V., Lominadze G.G., Kryzhanovskaya O.A., Katosova L.K. MALDI-TOF mass spectrometry in the routine work of the microbiological laboratory. *Voprosy diagnostiki v pediatrii.* 2011; 3(5): 20-5. (in Russian)
62. Chebotar' I.V., Ponomarenko O.A., Lazareva A.V., Karaseva O.V., Gorelik A.L., Bocharova YU.A. Using MALDI-TOF-technology for identification of pathogens of septic conditions in pediatric practice. *Klinicheskaya meditsina.* 2015; 7(2): 68-74. (in Russian)
63. Tadros M., Petrich A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and Sepsityper Kit™ for the direct identification of organisms from sterile body fluids in a Canadian Pediatric Hospital. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2013; 24(4): 191-4.
64. Lominadze G.G., Semenova E.A., Motuzova O.V., Kalakuckaya A.N., Lazareva A.V. Using the MALDI-TOF method of mass spectrometry to accelerate the identification of microorganisms in the blood cultures of patients with suspected sepsis. *Laboratornaya diagnostika; Spetsvyпуск № 4: «Laboratoriya LPU».* 2014: 17-20. (in Russian)
65. Murray P.R. What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J. Mol. Diagn.* 2012; 14(5): 419-23.
66. Priputnevich T.V., Melkumyan A.R., Burmenskaya O.V., Neshpa O.S., Nikitina I.V., Lyubasovskaya L.A. Using MALDI-TOF methods of mass spectrometry and quantitative PCR for rapid diagnosis of septic conditions. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2014; 16(1): 4-9. (in Russian)
67. Gray T.J., Thomas L., Olma T., Iredell J., Chen S. Rapid identification of Gram-negative organisms from blood culture bottles using a modified extraction method and MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 77(2): 110-2.
68. La Scola B. Intact cell MALDI-TOF mass spectrometry based approaches for the diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2011; 11(3): 287-98.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Затевалов А.М., Гудова Н.В., Оганесян А.С., Селькова Е.П., Миронов А.Ю., Гречишникова О.Г.

РЕФЕРЕНСНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СЛЮНЕ У ПАЦИЕНТОВ ОРИТ БЕЗ РЕСПИРАТОРНОЙ ПАТОЛОГИИ

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

Изучены биохимические показатели слюны у 47 пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) нейрохирургического стационара с разной степенью тяжести заболевания. Методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) подкисленного субстрата фильтрата слюны определены концентрации короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) и их референсные значения для пациентов без заболеваний респираторного тракта. Пороговые значения концентраций КЖК и значений их расчетных показателей определяли ROC – анализом с построением ROC-кривой, расчётом площади под кривой (AUC) и порога отсечения CutOff. Полученные референсные значения КЖК в слюне позволяют оценивать риски развития неблагоприятного течения болезни, оптимизировать тактику лечения и улучшить прогноз заболевания.

Ключевые слова: короткоцепочечные жирные кислоты; функциональная активность микробиоценоза; газовая хроматография; микробиоценоз ротоглотки; острые респираторные заболевания.

Для цитирования: Затевалов А.М., Гудова Н.В., Оганесян А.С., Селькова Е.П., Миронов А.Ю., Гречишникова О.Г. Референсные значения короткоцепочечных жирных кислот в слюне у пациентов ОРИТ без респираторной патологии. Клиническая лабораторная диагностика 2019; 64 (3): 153-157. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-153-157>
Zatevalov A.M., Gudova N.V., Oganesyanyan A.S., Selkova E.P., Mironov A. Yu., Grechishnikova O.G.

REFERENCE VALUES OF SHORT-CELLULAR FATTY ACIDS IN SALIVA IN INTENSIVE CARE UNIT PATIENTS WITHOUT RESPIRATORY PATHOLOGY

G. N. Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology, Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia

Biochemical indicators of saliva were studied in 47 patients of the intensive care unit and intensive care unit of a neurosurgical hospital with varying degrees of severity of the disease. The method of gas-liquid chromatography of the acidified substrate of the saliva filtrate determined the concentrations of short-chain fatty acids (SCFA) and their reference values for patients without respiratory tract diseases. The threshold values of the concentrations of SCFA and the values of their calculated indices were determined by ROC analysis with the construction of the ROC curve, calculation of the area under the curve (AUC) and the cutoff threshold CutOff. The method of determining reference values of HFA in saliva developed as a result of the study makes it possible to assess the risks of developing an unfavorable course of the disease, optimize treatment tactics and improve the prognosis of the disease.

Key words: short-chain fatty acids; functional activity of microbiocenosis; gas chromatography; oropharyngeal microbiocenosis; acute respiratory infections.

For citation: Zatevalov A.M., Gudova N.V., Oganesyanyan A.S., Selkova E.P., Mironov A. Yu., Grechishnikova O.G. Substantion of the reference Values of SCFA in saliva in patients without upper respiratory tract diseases. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (3): 153-157 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-153-157>

For correspondence: Zatevalov Alexander Mikhaylovich; e-mail: 89057149114@mail.ru

Information about authors:

Zatevalov A.M. <https://orcid.org/0000-0002-1460-4361>

Gudova N.V. <https://orcid.org/0000-0002-9579-1102>

Oganesyanyan A.S. <https://orcid.org/0000-0002-9038-3687>

Selkova E.P. <https://orcid.org/0000-0002-8534-8932>

Mironov A. Yu. <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>

Grechishnikova O.G. <https://orcid.org/0000-0002-0999-836X>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 12.02.2019
Accepted 20.02.2019

Введение. Перспективным направлением медицины XXI века признана персонифицированная медицина. «Реактивная» медицина реагирует на болезнь и борется с её симптомами, а персонифицированная

медицина направлена на предотвращение заболеваний, ключевое место в ней выделяется профилактике, индивидуализированному подходу к пациенту, активному участию самого пациента в лечении и профилактике заболеваний. Особое место в персонифицированной медицине занимает предиктивная медицина – поиск биомаркёров заболеваний и выявление синдромов – предвестников заболеваний [1].

Для корреспонденции: Затевалов Александр Михайлович, д-р биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. диагностики и профилактики инфекционных заболеваний; e-mail: 89057149114@mail.ru

Микробиота человека по совокупности клеточных форм микроорганизмов превосходит количество клеток организма в 10 раз [2]. Количество генов микробиоты превышает генома человека в 100 раз. Нормальная микробиота находится в симбиозе с организмом хозяина, выполняя ряд жизненно важных функций [2]. Важной функцией микробиоценоза является информационная составляющая микробиоты [3].

Количество видов микроорганизмов колонизирующих полость рта варьирует от 500 до 3500, большинство из которых ещё не описаны и полностью не изучены [2, 4]. Состав микробиоценозов слизистых оболочек определяется рецепторными особенностями эпителиоцитов конкретного биотопа и контролируется клеточными и гуморальными факторами мукозального иммунитета. Нормальная микрофлора включает сотни разнообразных видов, с общим численным составом 10^{13} клеток и выполняет ряд жизненно важных функций, обеспечивает колонизационную резистентность, детоксикацию, поддерживает оптимальный уровень метаболических процессов, иммунный статус организма и др. [2, 5–8].

Бактериальные и вирусные патогены способны преодолевать барьеры мукозального иммунитета, проникать во внутреннюю среду организма и вызывать инфекционный процесс. Зев имеет важное эпидемиологическое значение, поскольку бактерии из ротоглотки могут попадать в окружающую среду аэрогенно. В полости рта на микроорганизмы действует слюна, механически смывающая бактерии и содержащая антимикробные вещества (лизозим, муцин, sIgA). В полости рта имеются области, легко колонизируемые микроорганизмами. В состав микрофлоры полости рта входят различные микробные сообщества, многие из которых некультивируемые [9]. Культуральным методом можно изолировать не более 1% всех видов микроорганизмов микробиоценоза полости рта. Характеристика микробиоценоза на основании столь малого количества микроорганизмов не учитывает многих аспектов симбиотических взаимоотношений микроорганизмов, что отражается на эффективности лечения. Для оценки состояния микробиоценоза необходим системный подход, основанный на новых, более объективных физико-химических методах исследования, таких как: газо-жидкостная хроматография (ГЖХ), применяемая для изучения метаболического профиля микробиома ротоглотки [10–12].

ГЖХ для определения функционального состояния микробиоценозов по концентрациям короткоцепочечных жирных кислот (КЖК), в парадигме персонализированной медицины приобретает популярность у исследователей из-за высокой чувствительности и специфичности метода, возможности интегральной характеристики реактивности микробно-тканевого комплекса. Комплексный подход к оценке микробиологической системы организма за счёт дополнения культурального метода исследования биохимическими показателями, позволяет оптимизировать раннюю диагностику инфекционных заболеваний.

Цель исследования – определить референсные значения короткоцепочечных жирных кислот в слюне

пациентов без заболеваний респираторного тракта, госпитализированных в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ).

Материал и методы. Определены концентрации КЖК в слюне, рассчитаны структурный индекс, индекс изокилот, суммарная концентрация, профили концентраций КЖК у 47 пациентов с различными видами поражения ЦНС в возрасте 25–60 лет, находящихся в ОРИТ нейрохирургического стационара с различной степенью тяжести заболевания. Пациенты проходили лечение, соответствующее профилю лечебного учреждения. Отбор пациентов проводился на основании клинической картины болезни и данных лабораторного обследования. Гендерные различия не учитывались. Аналит (слюна, ротовая жидкость) отбирался при помощи одноразового шприца, доставлялся в лабораторию в течение 2-х часов. Исследование одобрено независимым этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора.

По типу питания, пациенты распределены на две группы. Пациенты, находящиеся на парентеральном питании отнесены к 1 группе – функциональное состояние микробиоценоза «неактивное», пациенты, принимавшие пищу самостоятельно, отнесены ко 2 группе – функциональное состояние микробиоценоза ротоглотки «активное».

Концентрации КЖК (уксусной, пропионовой, масляной, валериановой, капроновой кислот) и их изомеров в слюне определены методом ГЖХ подкисленного супернатанта фильтрата слюны. Концентрации КЖК в слюне имеют высокую дисперсию, зависящую от активности секреции слюнных желез, поэтому для исследования рассчитывались значения концентраций приведённых к суммарной концентрации КЖК в слюне. Рассчитаны относительные величины – структурный индекс (отношение суммы пропионовой, масляной, валериановой, капроновой кислот и их изомеров к концентрации уксусной кислоты), индекс изокилот (отношение суммы изомасляной, изовалериановой, изокапроновой кислоты к сумме масляной, валериановой, капроновой кислот). Структурный индекс характеризует активность облигатных анаэробов микрофлоры, индекс изокилот – протеолитическую активность микробиоценоза.

Хроматография проводилась на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 методом прямого ввода подкисленного супернатанта слюны в испаритель. Использована капиллярная кварцевая металлизированная колонка с неподвижной фазой FFPA. Газ-носитель – азот, детектор – пламенно-ионизационный, режим изотерма 150°С. Расчёт концентраций проводился по методу внутреннего стандарта. Идентификация КЖК проводилась по временам удержания пиков [9].

Метод прямого ввода пробы в испаритель хроматографа позволяет определить спектр КЖК, состоящий из уксусной, пропионовой, масляной, валериановой, капроновой кислот и их изомеров. Из всего спектра КЖК, 90% массы приходится на уксусную, пропионовую, масляную кислоты. Соотношение концентраций уксусной, пропионовой, масляной кислот в их сумме служит индикатором целостности микробного

Функциональная активность микробиоценоза ротоглотки пациентов

| Показатель | Функциональное состояние микробиоценоза ротоглотки | | Уровень значимости, $p < 0,05$ |
|---|--|------------------|--------------------------------|
| | неактивное | активное | |
| Концентрации КЖК в слюне, ммоль/г | | | |
| Суммарная концентрация КЖК | 0,6 (0,15-1,3) | 1,15 (0,4-4,49) | 0,441419 |
| Уксусная | 0,43 (0,13-0,99) | 0,69 (0,21-1,66) | 0,700312 |
| Пропионовая | 0,07 (0,01-0,13) | 0,1 (0,04-0,68) | 0,335925 |
| Изомасляная | 0,02 (0-0,05) | 0,23 (0,09-0,66) | 0,026886 |
| Масляная | 0,03 (0,01-0,03) | 0,04 (0,02-0,36) | 0,248214 |
| Изовалериановая | 0,01 (0-0,01) | 0,03 (0,02-0,09) | 0,026886 |
| Валериановая | 0,01 (0-0,01) | 0,04 (0,01-0,07) | 0,210963 |
| Изокапроновая | 0 (0-0) | 0,01 (0-0,01) | 0,018398 |
| Капроновая | 0 (0-0) | 0,01 (0-0,01) | 0,018398 |
| Расчётные индексы, ед. | | | |
| Структурный индекс | 0,29 (0,24-0,32) | 0,75 (0,54-0,82) | 0,000532 |
| Индекс изокислот | 1,03 (0,74-1,25) | 2 (1,6-2,86) | 0,001069 |
| Соотношение уксусной-пропионовой-масляной кислот, % | | | |
| Уксусная | 85 (82-87) | 79 (74-81) | 0,010774 |
| Пропионовая | 11 (10-13) | 14 (13-17) | 0,023742 |
| Масляная | 4 (3-5) | 7 (5-8) | 0,023742 |
| Концентрации КЖК в слюне, приведённые к их сумме, ед. | | | |
| Уксусная | 0,77 (0,76-0,81) | 0,57 (0,55-0,65) | 0,000532 |
| Пропионовая | 0,1 (0,1-0,12) | 0,11 (0,1-0,13) | 0,500582 |
| Изомасляная | 0,03 (0,02-0,05) | 0,14 (0,1-0,24) | 0,000532 |
| Масляная | 0,04 (0,03-0,04) | 0,05 (0,04-0,07) | 0,210963 |
| Изовалериановая | 0,01 (0,01-0,02) | 0,04 (0,02-0,06) | 0,054293 |
| Валериановая | 0,01 (0,01-0,02) | 0,02 (0,02-0,04) | 0,289840 |
| Изокапроновая | 0 (0-0,01) | 0,01 (0-0,02) | 0,123659 |
| Капроновая | 0 (0-0,01) | 0,01 (0-0,02) | 0,123659 |

Примечание. Полужирным курсивом отмечены значения $p < 0,05$, указывающие на статистически значимые различия групп.

сообщества ротоглотки [13]. Характеристикой функциональной активности симбионтной микробиоты служит структурный индекс, который рассчитывается как отношение суммы концентраций пропионовой, масляной, валериановой, капроновой кислот и их изомеров к концентрации уксусной кислоты. Протеолитическая активность микробиоты ротоглотки оценивается по индексу изокислот, который рассчитывается как отношение суммы концентраций изомасляной, изовалериановой, изокапроновой кислот к сумме концентраций масляной, валериановой, капроновой кислот в слюне [14].

Полученные выборки для исследуемых групп оценивались на наличие нормального распределения по критерию Шапиро-Уилка. В связи с отсутствием нормального распределения различия медианных средних значений выборок и интерквартильный размах сравнивали по U-критерию Манна-Уитни. Пороговые значения концентраций КЖК и значений их расчётных показателей определяли ROC-анализом с построением ROC-кривой, расчётом площади под кривой (AUC) и порога отсечения CutOff. Пороговое значение концентрации каждого показателя определяли по значению CutOff. При анализе значение $p < 0,05$ принималось как статистически значимое различие.

Результаты и обсуждение. Определены концентрации уксусной, пропионовой, масляной, валериановой,

капроновой, изомасляной, изовалериановой, изокапроновой кислот в слюне. Для оценки состояния микробиоценоза использованы суммарные концентрации КЖК. Метаболическую активность микробиоценоза оценивали по сумме концентраций КЖК. Состояние анаэробного компонента микробиоценоза оценивали по структурному индексу. Протеолитическую активность микробиоценоза оценивали по индексу изокислот.

Вся выборка и подгруппы оценивались на наличие нормального распределения по критерию Шапиро-Уилка. Нормальное распределение не наблюдалось ни в одной из подгрупп. Для статистического описания групп использованы медианные значения для оценки средних и интерквартильный интервал для оценки разброса. Концентраций КЖК в слюне представлены в табл. 1.

Концентрации КЖК в слюне активного микробиоценоза имеют более высокие значения. Уровень достоверности, позволяющий подтвердить статистическую значимость изменений, подтверждает увеличение концентраций изомасляной, изовалериановой, изокапроновой, капроновой кислот в слюне. Высокий уровень статистической значимости отмечается для структурного индекса и индекса изокислот. Для активного микробиоценоза характерна более высокая протеолитическая активность микроорганизмов

Референсные значения концентраций КЖК в слюне и их прогностическая значимость

| Показатель | Площадь под кривой ROC area (AUC) | Направленность значения | Пороговое значение |
|---|-----------------------------------|-------------------------|--------------------|
| Структурный индекс, ед. | 1,000 | не менее | 0,436 |
| Индекс изокислот, ед | 0,972 | не менее | 1,578 |
| Соотношение уксусная: пропионовая: масляная | | | |
| Уксусная, % | 0,875 | не более | 82,4 |
| Пропионовая, % | 0,813 | не менее | 13,3 |
| Масляная, % | 0,833 | не менее | 5,0 |
| Приведенные концентрации КЖК, ед. | | | |
| Уксусная | 1,000 | не более | 0,714 |
| Пропионовая | 0,597 | не менее | 0,112 |
| Изомасляная | 1,000 | не менее | 0,070 |
| Масляная | 0,681 | не менее | 0,042 |
| Изовалериановая | 0,771 | не менее | 0,022 |
| Валериановая | 0,660 | не менее | 0,017 |
| Изокапроновая | 0,729 | не менее | 0,006 |
| Капроновая | 0,729 | не менее | 0,006 |

и высокая функциональная активность индигенной микрофлоры.

Соотношения уксусной – пропионовой – масляной кислот в слюне характеризуются статистически значимыми различиями исследуемых групп. Приведённые к суммарной концентрации КЖК не имеют статистически значимых отличий для всех компонентов, кроме уксусной и изомасляной кислот.

Для определения пороговых значений концентраций КЖК, приведённых к их сумме, структурного индекса, индекса изокислот, значения в соотношении уксусной, пропионовой, масляной кислот проведён ROC-анализ. Пороговые значения вычислялись по значению CutOff, прогностическая значимость оценивалась по значению площади под кривой AUC. Результаты ROC-анализа представлены в табл. 2.

Из данных, представленных в табл. 2 следует, что критерии функциональной активности микрофлоры ротоглотки – структурный индекс и индекс изокислот имеют очень высокие показатели прогностической значимости. Из данных табл. 1 следует, что для данных показателей интерквартильные интервалы не пересекаются, уровень значимости существенно ниже значения 0,05. Структурный индекс, характеризующий функциональную активность индигенной микрофлоры, и индекс изокислот, характеризующий протеолитическую активность микрофлоры ротоглотки, являются приоритетными критериями для оценки микробиоценоза ротоглотки.

Для соотношения концентраций уксусной – пропионовой – масляной кислот отмечаются высокие значения AUC, между выборками групп имеются статистически значимые отличия, что позволяет использовать данные показатели в качестве критериев оценки функциональной активности микробиоценоза.

Концентрации КЖК характеризуются значениями AUC выше 0,5, что указывает на их положительную прогностическую значимость. Классификатором с наименьшей прогностической значимостью является концентрация пропионовой кислоты в слюне. Низкие

значения прогностической значимости у концентраций валериановой, масляной, изокапроновой, капроновой кислот.

Заключение. Нарушения микробиоценоза слизистых оболочек создают условия для снижения местного иммунитета, клиническими проявлениями которого является воспалительные процессы, частый их переход в хроническое течение, рецидивы, низкая эффективность общепринятых схем противовоспалительной терапии [15]. Для оценки функционального состояния микробиоценоза ротоглотки целесообразно использовать профили концентраций КЖК, поскольку значения имеют наименьшую дисперсию. Интегральным показателем оценки микробиоценоза ротоглотки является структурный индекс. При его значении менее 0,436 ед. отмечается нарушение функциональной целостности микробного сообщества микробиоценоза ротоглотки.

Для прогноза течения заболевания и коррекции лечения пациентов ОРВИ, значение структурного индекса по концентрациям КЖК слюны служит критерием оценки функционального состояния микробиоценоза ротоглотки.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 8 см. REFERENCES)

1. Лазебник Л. Б., Стефанюк О. В. Концепция развития европейского здравоохранения до 2040 года — взгляд в будущее. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015; 117 (5):51-7.
2. Миронов А. Ю. Основы клинической микробиологии и иммунологии. Воробьев А.А., ред. М.: ММА им. И. М. Сеченова; 1997.
3. Ткаченко Е.И., Успенский Ю.П. Питание, микробиоценоз и интеллект человека. СПб.: СпецЛит; 2006.
4. Зеленова Е. Г., Заславская М. И., Салина Е. В., Рассанов С. П. Маянский А. Н. , Микрофлора полости рта: норма и патология. Н. Новгород: Изд-во НГМА; 2004.
5. Горелов А.В., Плоскирева А.А., Бондарева А.В., Каннер Е.В.

- Пробиотики в комплексной профилактике респираторных инфекций. *Вопросы практической педиатрии*. 2014; 9 (5): 77-83.
6. Николаева С.В., Усенко Д.В., Эффективность пробиотиков и пробиотических продуктов в профилактике острых респираторных инфекций у детей и взрослых. *Лечащий врач*. 2015; 2: 36-8.
 7. Шендеров Б.А. Медицинская микробиология и функциональное питание. М.: Грантъ; 2001.
 9. Борисова О.Ю., Алешкин В.А., Пименова А.С., Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Гуров А.В. и др. Микробный состав микрофлоры ротоглотки у больных с тонзиллярной патологией. *Инфекция и иммунитет*. 2015;5(3):225-32.
 10. Мескина Е.Р., Медведева Е.А., Е.В. Русанова, Затевалов А.М. Респираторные инфекции у часто болеющих детей: новый взгляд на проблему. *Лечение и профилактика*. 2015; 16 (4): 47-54.
 11. Миронов А. Ю., Зур Н. В. Молекулярные маркеры патогенов. М.: ООО «Тираж»; 2013.
 12. Акайзин Э.С., Гагуа А.К., Метелев А.С. Показатели летучих жирных кислот для дифференциальной диагностики гнойных осложнений панкреонекроза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 62 (12): 750-5.
 13. Алешкин В.А., Ардатская М.Д., Бабин В.Н., Дубинин А.В., Иконников Н.С., Кондракова О.А., Минушкин О.Н. Способ разделения смеси жирных кислот, фракций C2 – C7 методом газожидкостной хроматографии. Патент РФ 2145511; 2000.
 14. Затевалов А.М., Алешкин В.А., Селькова Е.П., Гренкова Т.А. Определение критической для функциональной активности нормальной микрофлоры кишечника и ротоглотки величины концентрации масляной кислоты в кале пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, находящихся на зондовом питании. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2017; 2(1): 14-22.
 15. Хорошилова Н.В. Пробиотики и бактериальные иммуномодуляторы для профилактики респираторной инфекции. *Вопросы современной педиатрии*. 2014; 4: 93-5.
-
1. Lazebnik L. B., Stefanyuk O. V. The concept of the development of European health care until 2040 - a look into the future. *Experimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2015; 117 (5): 51-7. (in Russian)
2. Mironov A. Yu. Fundamentals of clinical microbiology and immunology. [Osnovy klinicheskoy mikrobiologii i immunologii]. Vorob'yov A.A., ed. Moscow: Moskovskaya meditsinskaya akademiya imeni I.M. Sechenova; 1997. (in Russian)
 3. Tkachenko E.I., Assumption Yu.P. Nutrition, microbiocenosis and human intelligence. [Pitanie mikrobiotsenoz i intellekt cheloveka]. St.Petersburg: SpetsLit; 2006. (in Russian)
 4. Zelenova E. G., Zaslavskaya M. I., Salina E. V., Rassanov S. P. Mayansky A.N. Oral microflora: norm and pathology. [Mikroflora polosti rta: norma i patologiya]. Nizhny Novgorod: Nizhegorodskaya gosudarstvennaya meditsinskaya akademiya; 2004. (in Russian)
 5. Gorelov A.V. Ploskireva A.A., Bondareva A.V., Kanner E.V. Probiotics in the complex prevention of respiratory infections. *Voprosy prakticheskoy pediatrii*. 2014; 9 (5): 77-83. (in Russian)
 6. Nikolaev S.V., Usenko D.V., Nikolaev S.V. The effectiveness of probiotics and probiotic products in the prevention of acute respiratory infections in children and adults. *Lechashchiy vrach*. 2015; 2: 36-8. (in Russian)
 7. Shenderov B. A. Medical microbiology and functional nutrition [Meditsinskaya mikrobiologiya i funktsionalnoe pitaniye]. Moscow: Grant; 2001. (in Russian)
 8. Collins M.D., Gibson G.R. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *J. Clin. Nutr*. 1999; 69: 1052-7.
 9. Borisova O.Yu., Aleshkin V.A., Pimenova A.S., Kryukov A.I., Kunelskaya N.L., Gurov A.V., Shadrin G.B., Tovmasyan A.S. Efimov B.A., Kafarskaya L.I. The microbial composition of the oropharyngeal microflora in patients with tonsillar pathology. *Infektsiya i immunitet*. 2015; 5 (3): 225-32. (in Russian)
 10. Meskina E.R. Medvedeva E.A., Rusanova E.V., Zatevalov A.M. Respiratory infections in infants with frequent illnesses: a new look at the problem. *Lechenie i profilaktika*. 2015; 16 (4): 47 - 54. (in Russian)
 11. Mironov A. Yu., Zur N. V. Molecular markers of pathogens. [Molekulyarnye markyory patogenov]. Moscow: ООО Tirazh; 2013. (in Russian)
 12. Akayzin E.S., Gagua A.K., Metelev A.S. Indicators of volatile fatty acids for the differential diagnosis of purulent complications of pancreatonecrosis *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 12; 750 - 5. (in Russian)
 13. Aleshkin V.A., Ardatskaya M.D., Babin V.N., Dubinin A.V., Ikonnikov N.S., Kondrakova O.A., Minushkin O.N. A method for separating a mixture of fatty acids, C2 - C7 fractions by gas-liquid chromatography. Patent RF 214551; 2000. (in Russian)
 14. Zatevalov A.M., Aleshkin V.A., Selkova E.P., Grenkova T.A. Determination of the concentration of butyric acid in the feces of patients of the intensive care unit and intensive therapy who are on the probe nutrition, critical for the functional activity of the normal microflora of the intestine and oropharynx. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina*. 2017; 2 (1): 14-22. (in Russian)
 15. Khoroshilova N.V. Probiotics and bacterial immunomodulators for the prevention of respiratory infections. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2014; 4; 93-5. (in Russian)

Поступила 12.02.18
Принята к печати 20.02.18

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Амелина Е.А.¹, Арсеньева В.А.¹, Марданлы С.С.^{1,3}, Марданлы С.Г.^{1,2}

ПРИМЕНЕНИЕ НЕПРЯМОГО МЕТОДА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ IGM К ВИРУСУ ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА 6 ТИПА

¹ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск Московской обл., Россия;

²ГОУВ Государственный гуманитарно-технологический университет «ГГТУ», г. Орехово-Зуево Московской обл., Россия;

³Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф.Гамалеи Минздрава РФ», 123098, Москва, Россия

В последние годы особую актуальность приобрела своевременная диагностика герпесвирусной инфекции человека 6 типа (HHV6), особенно в педиатрии. В спектре серологической диагностики применен непрямой метод иммуноферментного анализа ИФА для выявления IgM к HHV-6 в исследовании образцов сывороток детей (198), условно здоровых пациентов (148) и доноров (145). Использование ИФА IgM HHV6 более значимо для расширения комплекса диагностического исследования заболевания, связанного с первичной инфекцией HHV6 или ее реактивацией.

Ключевые слова: герпесвирусные инфекции; вирус герпеса 6 типа; иммуноферментный анализ.

Для цитирования: Амелина Е.А., Арсеньева В.А., Марданлы С.С., Марданлы С.Г. Применение непрямого метода иммуноферментного анализа для выявления специфических IgM к вирусу герпеса человека 6 типа. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (3): 158-163. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-158-163>

AMELINA E.A.¹, ARSENYEVA V.A.¹, MARDANLY S.S.^{1,3}, MARDANLY S.G.^{1,2}

APPLICATION OF THE INDIRECT METHOD OF THE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE IDENTIFICATION OF SPECIFIC IGM TO HUMAN HERPES VIRUS 6 TYPE

¹ CJSC "EKOLab", Elektrogorsk, Moscow region;

² State educational institution of higher education of the Moscow region State Humanitarian University of Technology "GGTU", Orekhovo-Zuyevo, Moscow region;

³ State Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow.

In recent years, timely diagnosis of human herpes virus infection of type 6 (HHV6), especially in pediatrics, has acquired particular relevance. In the spectrum of serological diagnostics, an indirect ELISA method was used to detect IgM against HHV-6 in a study of samples of children sera (198), conditionally healthy patients (148) and donors (145). The use of ELISA IgM HHV6 is more significant for the expansion of the complex of the diagnostic study of the disease associated with primary HHV6 infection or its reactivation.

Key words: herpes virus infections; herpes virus type 6; enzyme immunoassay.

For citation: Amelina E.A., Arsenyeva V.A., Mardanly S.S., Mardanly S.G. Application of indirect enzyme immunoassay to detect specific IgM for human herpes virus type 6. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Clinical Laboratory Diagnostics) 2019; 64 (3): 158-163 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-158-163>

For correspondence: Amelina E.A., Candidate of Biological Sciences, Head of Advanced Development Department; e-mail: ekolab-ferment@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 24.01.2019
Accepted 01.03.2019

Введение. В последние годы активно изучают различные аспекты эпидемиологии, клиники и диагностики инфекции, вызванной герпесвирусом человека 6 типа (HHV-6). [4, 6, 9, 14, 19]. Согласно международной классификации HHV-6 — это ДНК-вирус подсемейства *Betaherpesvirinae* рода *Roseolovirus*, имеет два

серологических подтипа — 6А и 6В [5]. Подтипы А и В, различаются по эпидемиологии, географическому распространению, свойствам роста, последовательности нуклеотидов, сероэпидемиологии и причастности к различным заболеваниям [6]. Вирус герпеса типа 6 подтипа А связывают с синдромом хронической усталости, рассеянным склерозом, угнетением иммунитета и прогрессированием ВИЧ-инфекции. Вирус герпеса типа 6 подтипа В вызывает внезапную экзантему и энцефалит у детей, фебрильные судороги и эпилепсию, пораже-

Для корреспонденции: Амелина Елена Анатольевна, канд. биол. наук, нач. отд. перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб»; e-mail: ekolab-ferment@mail.ru

ние ЦНС (энцефалит, менингоэнцефалит, церебеллит); острые гепатиты, в том числе злокачественные формы с фульминантным течением.

Поэтому особую актуальность своевременная диагностика HHV-6В инфекции приобретает в современной педиатрии [1-3, 8]. Инфицирование герпес вирусом 6 типа происходит, как правило, в раннем детстве, чаще – от 6 до 18 месяцев. В большинстве случаев острая HHV-6 не дает клинической картины, характерной для данного заболевания (внезапная экзантема), и инфицирование, и персистенция HHV-6 могут проходить бессимптомно. Более того, HHV-6 является наиболее распространенной среди герпесвирусных инфекций среди детей и представлена в большинстве случаев в виде микст-инфекций с другими герпесвирусами. При реактивации HHV-6 или в сочетании его с вирусом Эпштейна-Барра и цитомегаловирусом может наблюдаться клиническая картина инфекционного мононуклеоза [11, 15].

У детей с ОРВИ преобладают активные формы инфекции как первичной острой HHV-6, так и реактивации хронической персистирующей инфекции [7, 11]. Неправильный диагноз в отношении герпес инфекции ведет к ошибкам в ведении больных (назначение антибиотиков, неправильный выбор противовирусных препаратов в случае осложнений), к неверному клиническому диагнозу. Активные формы HHV-6 инфекции требуют проведение противовирусной терапии, поэтому необходимо проведение дополнительных методов лабораторного обследования [11, 14].

Реактивация HHV-6 у взрослых обуславливает смертность и болезнь среди пациентов после пересадки органов и костного мозга, а также у больных СПИД. У лиц с иммунодефицитом HHV-6 может быть причиной лихорадки, снижения функции и отторжения трансплантата, пневмонии, гепатитов, поражений ЦНС.

Диагноз острой HHV-6 инфекции ставится на основании совокупности клинических данных и комплекса лабораторных методов (иммунохимических и молекулярно-биологических). В этом комплексе особое место среди иммунохимических методов занимает метод иммуноферментного анализа, ориентированный на выявление специфических антител класса М и G. Выявление IgM возможно с 4—7-го дня инфекционного процесса, титр антител достигает максимума ко 2—3-й неделе, через 2 месяца антитела уже не выявляются [9, 20].

По мнению некоторых авторов у некоторых детей с первичной инфекцией не развивается необходимый для определения уровень IgM. Кроме того, по некоторым данным специфические IgM не появляются при реактивации инфекции [19]. Некоторые исследования показали, что 4- 5% взрослых людей постоянно имеют антитела класса М [22]. В целом, коммерческие иммуноферментные тест-системы для выявления М антител широко не применяются для серологической диагностики HHV-6, если не сказать, что вообще не используются.

Выявление антител G возможно с 7—10-го дня болезни, то есть практически одновременно с IgM, титр

достигает максимума ко 2—3-й нед и сохраняется на всю жизнь. Так как первичное заражение HHV-6 происходит в первые годы жизни, у малолетних детей наряду с выявлением IgM, и IgG против HHV-6 является хорошим маркером первичной инфекции HHV-6 при исследовании случаев внезапной экзантемы, фебрильных приступов, лихорадки без очага инфекции и кожной сыпи [17]. Поскольку большинство людей старше двухлетнего возраста имеют антитела к вирусу герпеса типа 6 (около 95% взрослых), для диагноза необходимы парные сыворотки, взятые с интервалом в 2-4 нед, для установления диагностического нарастания антител G к HHV-6 [10,16]. Хотя повышение их титра не позволяет дифференцировать первичную инфекцию от реактивации, с большой долей вероятности у взрослых мы имеем дело с реактивацией инфекции.

Выявление специфических антител класса М априори является признаком первичной (или активной инфекции). Проведено много исследований по определению специфических IgM к HHV-6 иммунохимическими методами среди разного контингента людей: детей и взрослых, доноров и лиц с клинически подтвержденным диагнозом [13,15,20,23]. Показано, что иммуноферментное выявление специфических антител М к HHV-6 кажется самым действительным для диагностики первичной инфекции HHV-6, отсутствие перекрестных реакций с ВЭБ или ЦМВ IgM-положительными сыворотками позволило декларировать специфичность метода до 98% [20], как и в другом исследовании образцов сывороток крови методом непрямого иммуноферментного анализа [13]. Исследования с использованием реакции иммунофлюоресценции выявили у 15 -53% здоровых лиц антитела М к HHV-6 [12, 18, 21]. Безусловно, процент выявляемых положительных реакций зависит и от метода исследования, и от его клинической чувствительности и специфичности [21]. Иногда высокой процент выявления специфических антител к HHV-6 связывают с ложноположительными реакциями анализа, перекрестными взаимодействиями, но и подлинная реактивация HHV-6 у взрослых, в том числе и у здоровых доноров также, по-видимому, имеет место [17].

Цель исследования – применение метода непрямого ИФА для создания набора реагентов с целью выявления IgM к HHV-6 в исследовании образцов сывороток детей, условно здоровых пациентов и доноров.

Материал и методы. Набор реагентов для выявления IgM к HHV-6 методом непрямого иммунофлюоресцентного анализа – *Human Herpesvirus 6 IgM assay, I-HV603M, SCIMEDX Corporation, США.* Сыворотки исследовали в реакции непрямого иммунофлюоресценции, учет и анализ результатов проводили в соответствии с инструкцией производителя SCIMEDX Corporation, США.

Образцы сывороток здоровых доноров, детей и условно здоровых пациентов, проходивших обследование в ЛПУ, предоставлены диагностическим центром ЗАО «Эколаб» «El Clinic».

Для приготовления иммуносорбента использовали рекомбинантный очищенный антиген HHV-6, содер-

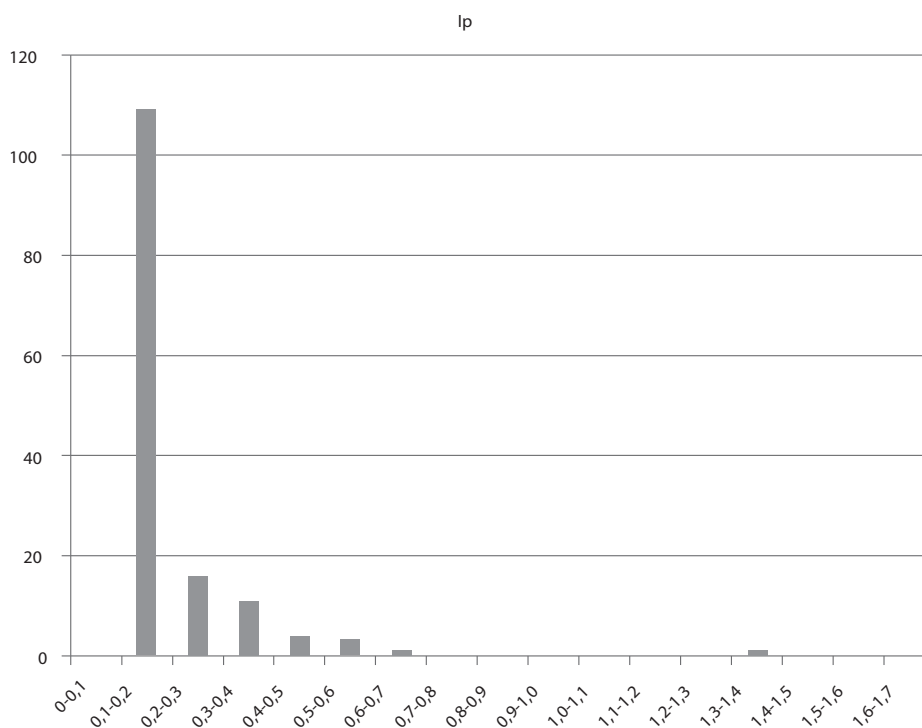


Рис. 2. Диаграмма распределения коэффициента позитивности Ip среди 145 образцов сыворотки крови доноров в ИФА при выявлении антител класса М.

По оси абсцисс – интервал оптической плотности (ОП) реакции ИФА; по оси ординат – количество образцов сыворотки крови, имеющих результат ИФА в данном интервале ОП.

жащий основной иммунодоминантный белок р101К генома ННV-6 (ЗАО «ЭКОлаб», кат. № 41.44).

Разборные полистироловые планшеты для иммунологических реакций с плоским дном (Nunc, Дания, кат. № 446469).

Конъюгат: моноклональные антитела к IgM человека, связанные с пероксидазой («ЗАО «ЭКОлаб», кат. № 40.06).

Неспецифические реагенты для иммуноферментного анализа производства ЗАО «ЭКОлаб»: субстратно-индикаторный раствор, содержащий хромоген – тетраметилбензидин (кат. № 40.07), 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином ФСБ-Т(х25), стоп-раствор 0,5 М серной кислоты.

Проведение ИФА. Очищенный рекомбинантный антиген (в концентрации 2,5 мкг/мл) в 100мМ карбонат-бикарбонатном буфере рН 9,6 вносили в лунки планшета объемом 100 мкл в каждую лунку,

инкубировали ночь при температуре 4°C. На следующий день вносили блокирующий раствор для «закрытия» свободных зон пластика для неспецифической сорбции на этапах проведения ИФА – по 200 мкл в каждую лунку. Выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Затем удаляли блокирующий раствор из лунок планшета, планшет высушивали. Сушку осуществляли при температуре 25–27°C и относительной влажности не более 60% в течение 2,5 – 3 часов. Планшеты запаивали с помощью устройства для вакуумной запайки в пакеты из алюминиевой фольги на полиэтиленовой основе.

В ИФА для разведения исследуемых образцов сывороток (плазмы), их титрования использовали фосфатный буфер, содержащий анти-IgG блокирующий раствор для исключения интервенции IgG антител за центры связывания антигена и влияния ревматоидного фактора. Антитела исследуемых образцов (при наличии) взаимодействовали с рекомбинантным

Таблица 1

Активность Ig G/M антителообразования в сыворотках острой и восстановительной фазы собранных у взрослых пациентов, прошедших обследование в ЛПУ и диагностическом центре «EI Clinic»

| Характеристика сыворотки по наличию антител класса G | Количество исследованных образцов на наличие Ig G/M к ННV-6 | | | |
|--|---|---|--|-----|
| | Всего | Нарастание титра IgG в парных сыворотках. Сероконверсия | Определено наличие IgM к ННV-6 в острой фазе | |
| | | | ИФА | РИФ |
| Определено наличие IgG к ННV-6 | 148 | 3 | 3 | 3 |
| Определено отсутствие IgG к ННV-6 | 145 | 0 | 1 | 1 |

Таблица 2

Активность IgM антителообразования в сыворотках острой фазы цитомегаловирусной инфекции, собранных у взрослых пациентов, проходивших обследование в ЛПУ и диагностическом центре «El Clinic»

| Характеристика сыворотки по наличию антител класса М | Количество исследуемых образцов на наличие Ig М к HHV-6 | | | |
|--|---|-----------------------------------|--|-----|
| | Всего | Определено отсутствие IgM к HHV-6 | Определено наличие IgM к HHV-6 в острой фазе | |
| | | | ИФА | РИФ |
| Определено наличие IgM к ЦМВ | 15 | 14 | 1 | 1 |

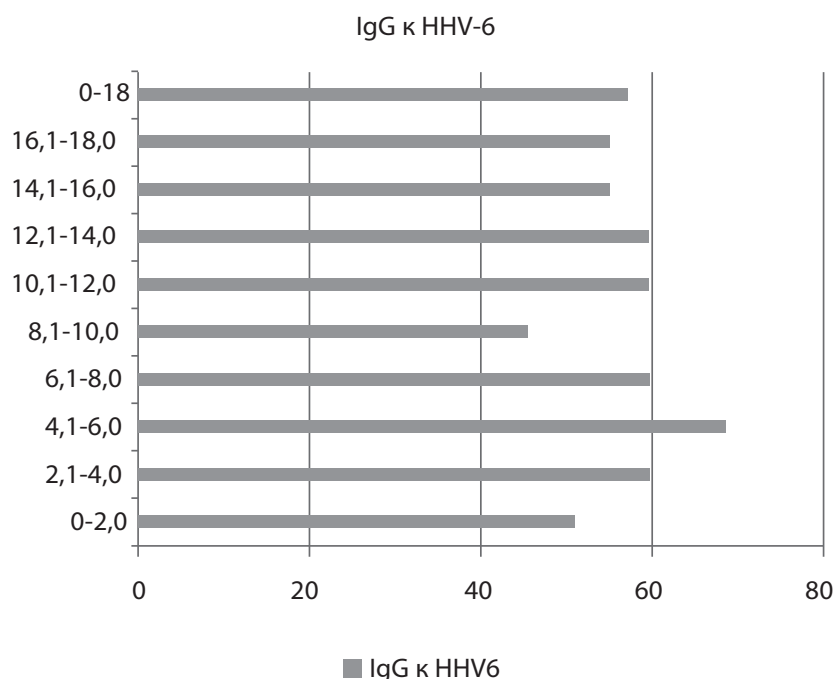


Рис. 3. Диаграмма распределения выявляемости антител класса G в образцах сывороток крови детей из ЛПУ Люберецкого района Московской области в возрасте от 0 до 18 лет.

антигеном, иммобилизованным в лунке планшета на первой стадии ИФА 30 мин при 37°C. Во время второй инкубации (30 мин при 37°C) антивидовой конъюгат связывается с образованием комплекса: / антиген иммуносорбента/-/антитела образца/ - анти IgM конъюгат. Наличие последнего выявляется по цветной реакции с ТМБ-субстратно-индикаторным раствором, интенсивность окрашивания реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации антител к HHV-6 в образце. Результаты ИФА регистрировали спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность реакции при – 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620–650 нм.

В исследовании образцов сывороток были применены иммуноферментные тест-системы «ИФА-ЦМВ-IgG», «ИФА-ЦМВ-IgM», «ИФА-ВГЧ6-IgG», разработанные и производимые ЗАО «Эколаб».

Результаты и обсуждение. У взрослых пациентов, проходящих обследование в диагностическом центре «El Clinic», были взяты образцы сывороток крови с интервалом в 2 недели. С использованием

ИФА на наборе реагентов ЗАО «Эколаб» «ИФА-ВГЧ6-IgG» были отобраны 148 образцов сыворотки крови, содержащих специфические антитела класса G к вирусу герпеса 6 типа, причем три образца показывали увеличение титра IgG в динамике. Так как нарастание титра IgG и выявление антител IgM – признаки острой (активной инфекции), для образцов сывороток взрослых пациентов нарастание титра IgG косвенно может служить признаком возможной реактивации HHV-6. В реакции иммунофлюоресценции «IFA Human Herpesvirus 6 (HHV-6) IgM Assay» производства фирмы SCIMEDX Corporation, США, установлено, что, выявленные ранее 3 образца, по результатам анализа содержат антитела класса М (рис.1 а, б, см.обложку).

В непрямом методе ИФА на твердофазном носителе с использованием рекомбинантного антигена эти сыворотки определены как положительные, то есть содержащие специфические IgM к HHV-6 в разных титрах (табл. 1).

Исследование 145 образцов сыворотки крови доноров в ИФА определило один образец с IgM анти

HHV-6 (коэффициент позитивности 1,4), что было подтверждено реакцией иммунофлюоресценции в "IFA Human Herpesvirus 6 (HHV-6) IgM Assay" (табл. 1, рис.2). Недавняя реактивация HHV-6 может быть наиболее вероятным объяснением. Исключая ложноположительные реакции анализа, перекрестные взаимодействия с другими герпес вирусными инфекциями бета подсемейства, возможно мы имеем дело с истинной реактивацией HHV-6 в отсутствии клинических симптомов обострения.

Вирус герпеса типа 6 имеет биологическое и генетическое родство с цитомегаловирусом. Для изучения возможности перекрестного взаимодействия антител класса М к ЦМВ с HHV-6, были отобраны 15 образцов сыворотки крови с высоким коэффициентом позитивности в «ИФА-ЦМВ-IgM» и исследованы в ИФА HHV-6.

Результаты анализа представлены в табл. 2. Один образец сыворотки был положителен, коэффициент позитивности составил 1,1, результат анализа был подтвержден в реакции иммунофлюоресценции. Вероятно, это случай микст-инфекции.

Часто причины реактивации HHV-6 остаются неопределенными, существует мнение, что первичные герпесвирусные инфекции могут являться триггером для реактивации HHV-6. Выявление IgM-анти-HHV-6 следует интерпретировать осторожно. Сообщается о реактивации ЦМВ, сероконверсии HHV-6 IgG и выявлении HHV-6 IgM у пациента с первичной EBV-инфекцией [17].

Методом ИФА исследованы 198 образцов сывороток крови детей из ЛПУ Люберецкого района Московской области в возрасте от 0 до 18 лет на содержание антител к HHV-6 (рис. 3). В возрасте от 0 до 1 года наличие в крови антител класса G к HHV-6 можно отнести за счет материнских антител, в более старших группах детей наличие антител является показателем инфицированности. В младшей группе детей антитела класса М к HHV-6 выявлены не были.

Диагностическая ценность метода ИФА выявления IgM к HHV-6 у детей раннего возраста более определенная. Хотя у большинства детей в возрасте 2-22 месяцев с клиническими признаками HHV-6 регистрировали ответ специфических IgM примерно в то же время, что и IgG-антител, в отдельных случаях наблюдается не классическая картина гуморального ответа на HHV-6, что требует проведения исследования образца сыворотки крови на антитела М и G класса [17].

Поэтому применение метода ИФА, позволяющего выявлять специфические антитела М класса к HHV-6, становится более значимо для расширения диагностического исследования спектра заболевания, связанного с первичной инфекцией HHV-6 или реактивацией.

Заключение. Применение метода ИФА, обладающего высокой чувствительностью и специфичностью, для выявления IgM анти HHV-6 расширяет возможности серологической диагностики первичной HHV-6 и ее реактивации. Без клинических признаков реактивации HHV-6 может определяться и у условно здоровых пациентов и доноров. ИФА позволит в дальнейшем

провести более масштабное исследование реактивации HHV-6 у взрослых пациентов и детей.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам отдела перспективных разработок ЗАО «ЭКОлаб» за оказанную помощь при проведении исследований.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 12 -23 см. REFERENCES)

1. Абатуров А.Е., Шостакович-Корецкая Л.Р. HHV-6-инфекция у детей. *Инфекции у детей*. 2007; 3 (6): 18-24.
2. Демидова М.В., Кравченко Л.В., Левкович М.А., Афонин А.А. Современное состояние проблемы герпесвирусной инфекции 6 типа у детей. *Детские инфекции*. 2013; 3: 20-3.
3. Детская и перинатальная смертность в России: тенденции, структура, факторы риска. *Социальные аспекты здоровья населения*. 2008; 1: <http://vestnik.mednet.ru/>.
4. Калугина М.Ю., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н. и др. Актуальность диагностики инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6-го типа. *Детские инфекции*. 2012; 1: 60-3.
5. Каражас Н.В., Малышев Н.А., Рыбалкина Т.Н., Калугина М.Ю. и др. Герпетические инфекции. Эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика. Методические рекомендации. *Правительство Москвы, Департамент здравоохранения; Спецкнига*; 2012.
6. Мелёхина Е.В., Музыка А.Д., Калугина М.Ю. и др. Современные представления об инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа. *Архив внутренней медицины*. 2016; 1(27): 13-9.
7. Мелёхина Е.В., Музыка А.Д., Петухова Е.В. и др. Методы этиологической диагностики инфекции вируса герпеса человека 6 типа у детей с острыми респираторными заболеваниями. *Молекулярная диагностика*. 2017; 1(1): 222-3.
8. Никольский М.А., Радыш М.В. Роль вирусов герпеса человека 6 и 7-го типов в возникновении фебрильных судорог у детей. *Вопросы диагностики и педиатрии*. 2012; 4(4): 46-8.
9. Никольский М.А. Инфекция, вызываемая вирусом герпеса человека 6 типа у детей: современное состояние проблемы. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2008; 2: 93-6.
10. Никольский М.А., Мессорош В.Г., Минченко С.И. Сероконверсия и нарастание концентрации IgG-антител при инфекции, вызванной вирусом герпеса 6-го типа у детей. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2008; 4: 22-4.
11. Околышева Н.В., Климова Р.Р., Чичев Е.В., Кистенева Л.Б., Малышев Н.А., Куш А.А. Особенности течения инфекции, вызванной вирусом герпеса человека 6 типа у детей раннего возраста на фоне острой респираторной вирусной инфекции. *Детские инфекции*. 2014; 3: 19-23.

REFERENCES

1. Abaturov A.E., Shostakovich-Koretskaya L.R. HHV-6 infection in children. *Infektsii u detej*. 2007; 3 (6): 18-24. (in Russian)
2. Demidova M.V., Kravchenko L.V., Levkovich M.A., Afonin A.A. The current state of the problem of herpes infection 6 type in children. *Detskie infektsii*. 2013; 3. 20-3. (in Russian)
3. Child and perinatal mortality in Russia: trends, structure, risk factors. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya*. 2008; 1: <http://vestnik.mednet.ru/>. (in Russian)
4. Kalugina M.YU., Karazhas N.V., Rybalkina T.N. i dr. The relevance of diagnosis of infection caused by the human herpes virus 6th type. *Detskie infektsii*. 2012; 1: 60-3. (in Russian)
5. Karazhas N.V., Malyshev N.A., Rybalkina T.N., Kalugina M.YU. et al. Herpetic infections. Epidemiology, clinic, diagnosis, treatment and prevention. [Metodicheskiye rekomendatsii]. Moscow: Spetskniga; 2012. (in Russian)
6. Melokhina Ye.V., Muzyka A.D., Kalugina M.Yu. et al. Modern

- ideas about infection caused by the human herpes virus type 6. *Arkhiv vnutrenney meditsiny*. 2016; 1(27): 13-9. (in Russian)
7. Melokhina Ye.V., Muzyka A.D., Petukhova Ye.V. et al. Methods for the etiological diagnosis of human herpes virus infection of type 6 in children with acute respiratory diseases. *Molekulyarnaya diagnostika*. 2017; 1(1): 222-3. (in Russian)
 8. Nikolsky M.A., Radysh M.V. The role of human herpes viruses 6 and 7 types in the occurrence of febrile seizures in children. *Voprosy diagnostiki i pediatrii*. 2012; 4(4): 46-8. (in Russian)
 9. Nikolsky M.A. Infection caused by the human herpes virus type 6 in children: the current state of the problem. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2008; 2: 93-6. (in Russian)
 10. Nikolsky M.A., Messorosh V.G., Minchenko S.I. Seroconversion and increase in the concentration of IgG-antibodies during infection caused by the herpes simplex virus type 6 in children. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2008; 4: 22-4. (in Russian)
 - Okolysheva N.V., Klimova R. R., Chichev E.V., Kisteneva L.B., Malyshev N.A., Kush A.A. et al. Features of the course of infection caused by the human herpes virus type 6 in young children against the background of acute respiratory viral infection. *Detskiye infektsii*. 2014; 3: 19-23. (in Russian)
 11. Ablashi D.V., Eastman H.B., Owen C.B., Roman M.M., Friedman J, Zabriskie J.B. et al. Frequent HHV-6 reactivation in multiples sclerosis (MS) and chronic fatigue syndrome (CFS) patients. *J.Clin. Virol*. 2000; 16: 179-91.
 12. Dahl H., Linde A., Sundqvist V.A., Wahren B. An enzyme-linked immunosorbent assay for IgG antibodies to human herpes virus 6. *Journal of Virological Methods*. 1990; 29: 313-24.
 13. De Bolle L., Naesens L., De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features and therapy. *Clinical Microbiology reviews*. 2005; 18: 217-45.
 14. Mary T. Caserta, M.D., Caroline Breese Hall, M.D., Kenneth Schnabel, M.B.A., Geraldine Lofthus, Ph.D., Andrea Marino, M.S., Lynne Shelley, B.S. et al. Diagnostic Assays for Active Infection with Human Herpesvirus 6 (HHV-6). *J. Clin. Virol*. 2010; 48 (1): 55-7.
 15. Ethel C.S., Dolores B., Patricia B. et al. Isotype immune response of IgG antibodies at the persistence and reactivation stages of human herpes virus 6 infection. *J. Clin. Virol*. 2004; 31: 266-9.
 16. Fox J. D., Ward P., Briggs M. et al. Production of IgM antibody to HHV6 in reactivation and primary infection. *Epidemiol. Infect.* 1990; 104: 289-96.
 17. Ghodrtnama F, Wray D, Bagg J. Detection of serum antibodies against cytomegalovirus, varicella zoster virus and human herpesvirus 6 in patients with recurrent aphthous stomatitis. *J. Oral. Pathol. Med*. 1999; 28: 12-5.
 18. Overview on Testing for HHV-6 infection. <https://hhv-6foundation.org/patients/hhv-6-testing-for-patients>.
 19. Nielsen L., Vestergaard B.F. A mu-capture immunoassay for detection of human herpes virus-6 (HHV-6) IgM antibodies in human serum. *Journal of Clinical Virology*. 2002; 25: 145-54.
 20. Ranger-Rogez S, Vidal E, Liozon F, Denis F. Primary Sjogren's syndrome and antibodies to human herpesvirus type 6. *Clin. Infect. Dis*. 1994; 19: 59-60.
 21. Suga S., Yoshikawa T., Asano Y., Nakashima T., Yazaki T., Fukuda M. et al. IgM neutralizing antibody responses to human herpesvirus-6 in patients with exanthem subitum or organ transplantation. *Microbiol. Immunol*. 1992; 36: 495.
 22. Ward K.N., Couto Parada X., Passas J., Thiruchelvam A.D. Evaluation of the specificity and sensitivity of indirect immunofluorescence tests for IgG to human herpesviruses-6 and -7. *Journal of Virological Methods*. 2002; 106: 107-13.

Поступила 24.01.19
Принята к печати 01.03.19

КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Халиулин А.В., Гусякова О.А., Козлов А.В., Габрильчак А.И.

ПРОЦЕССЫ МЕТАБОЛИЗМА И МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

Тромбоциты выполняют основополагающие функции в обеспечении гемостаза. Кроме основной функции тромбообразования, кровяные пластинки реализуют ангиотрофическую, иммунную, транспортную функции, участвуют в активации гемостаза в плазме крови, в ретракции кровяного сгустка, фиксируют циркулирующие иммунные комплексы. Авторы представили современные данные о строении, молекулярных перестройках ультраструктур тромбоцитов, которые связаны с функцией открытой канальцевой системы тромбоцитов, плотной тубулярной системы и мембраны клеток. Охарактеризованы основы метаболизма тромбоцитов, и процессы, которые лежат в основе активации кровяных пластинок, связанных с усилением процессов метаболизма углеводов и жирных кислот, а так же описаны некоторые сигнальные системы, которые регулируют процессы индукции агрегации тромбоцитов. Приведены данные о значении липидных компонентов мембран активированных тромбоцитов, которые включают фосфолипиды разных классов, гликолипиды и спирт холестерин. Отражена роль регуляторных процессов нековалентной модификации некоторых белков тромбоцитов жирными кислотами. Основы метаболизма тромбоцитов являются актуальными в настоящее время и требуют комбинированного подхода при их оценке. Таким путем можно решить многие задачи клинической лабораторной диагностики, патобиохимии и фармакологии.

Ключевые слова: тромбоциты; активация; адгезия; агрегация метаболизм; ферменты; сигнальные пути.

Для цитирования: Халиулин А.В., Гусякова О.А., Козлов А.В., Габрильчак А.И. Процессы метаболизма и механизмы регуляции активности тромбоцитов (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (3): 164-169. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-164-169>.

Khaliulin A.V., Gusyakova O.A., Kozlov A.V., Gabrilchak A.I.

METABOLISM PROCESSES AND MECHANISMS OF REGULATION OF PLATELET ACTIVITY (REVIEW OF LITERATURE)

Samara State Medical University, 443099, Samara, Russia

Platelets play fundamental role in ensuring the hemostatic function in blood. In addition to this canonical function, the blood plates play angiostrophic, immunological, transport role, participate in the activation of plasma hemostasis, retraction of a blood clot, and can record circulating immune complexes. The review article presents current data on the structure and conjugation of molecular rearrangements of platelet ultrastructures associated with the functioning of an open canalicular platelet system, a dense tubular system, and a platelet cytoplasmic membrane. The main types of resting platelet metabolism, and the processes underlying the activation of platelets associated with the enhancement of carbohydrate and fatty acid catabolism are characterized, as well as some signaling pathways that regulate processes of induction of platelet aggregation. The data show the value of lipid components of activated platelet membranes, including phospholipids of various classes, glycolipids and cholesterol. The role of regulatory processes associated with the non-covalent modification of certain platelet proteins with fatty acids is reflected. Fundamental questions of platelet metabolism are relevant nowadays and require a combined approach of studying them, which can potentially solve many problems of clinical laboratory diagnostics, pathobiochemistry, and pharmacology. In preparing the review, we used sources from international and russian databases: Scopus, Web of Science, RSCI.

Key words: platelets; activation; adhesion; aggregation; metabolism; enzymes; signaling pathways.

For citation: Khaliulin A.V., Gusyakova O.A., Kozlov A.V., Gabrilchak A.I. Metabolism processes and mechanisms of regulation of platelet activity (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (3): 164-169 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-164-169>

For correspondence: Khaliulin A.V., Senior Lecturer of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics ; e-mail: bio-sam@yandex.ru

Information about authors:

Khaliulin A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4689-8904>
Gusyakova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5619-4583>
Kozlov A.V. <https://orcid.org/0000-0001-9384-6854>
Gabrilchak A.I. <https://orcid.org/0000-0003-2474-3127>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 16.03.2019
Accepted 20.03.2019

Тромбоциты – бесцветные форменные элементы крови разной формы, включая округлую, овальную, дисковидную; они исполняют, главным образом, основную роль в защите организма от кровопотери путем обеспечения тромбоцитарного звена гемостаза [1]. Понятие «тромбоцит» ограничено используются в медицинской практике, более широкое применение нашел термин «пластинка», которое наиболее активно используют в англоязычной литературе [2]. При этом термин «тромбоцит» используют для обозначения ядросодержащих клеток, которые участвуют в процессах гемостаза у млекопитающих [3]. С исторической точки зрения, тромбоциты детально описаны, изучены в 1882 г. итальянским гистологом Джулио Биццоцери; впервые же их обнаружил А. Донне в 1842 г.; подсчитал их француз Ж. Гайем [4].

Сегодня известно, что тромбоцит – безъядерная клетка размером 2-4 мкм и средним объемом 7,5 фл. [1, 5, 6]. Формирование тромбоцитов происходит в костном мозге в ходе тромбоцитопоэза в мегакариоцитарном ростке. В среднем из одного мегакариоцита образуются 4000 кровяных пластинок, при этом размер тромбоцита зависит от степени зрелости мегакариоцита, от плоидности клеток мегакариоцитарного ростка. Предложено несколько сценариев образования тромбоцитов: согласно одному из них, тромбоциты отщуриваются, по отдельности или одновременно от материнской клетки, цитоплазму которой разделяют демаркационные мембраны. Согласно другой версии, в тромбоцитопоэзе главенствует тубулярная система мегакариоцитов; в итоге это приводит к отделению тромбоцитов в виде «бус»; возможно и образование псевдоподий, которые через миграционные поры попадают в синусоидные капилляры и тромбоциты выходят в кровеносное русло [1].

Ультраструктура тромбоцита во многом напоминает общеизвестную модель строения эукариотической клетки, однако имеются и ряд особенностей субклеточной организации кровяных пластинок. Как уже отмечено выше, тромбоциты не имеют ядра, возможности синтеза белков в тромбоцитах так же ограничены [7]. Одновременно кровяные пластинки характеризует богатый набор гранул, наличие митохондрий, широко представленная сеть микротрубочек, миофиламентов, канальцев и пузырьков. При световой микроскопии в тромбоцитах можно выявить бесструктурный гиаломер и грануломер, которые формируют жидкую часть цитоплазмы – совокупность органелл тромбоцита. Что касается гранул и их состава, то оценены они давно и выделяют 3 вида гранул: α -гранулы, плотные гранулы и лизосомы. Состав гранул тромбоцитов представлен в таблице [8-12].

Особое значение в тромбоцитах исполняет открытая канальцевая система (ОКС); это система канальцев, посредством которых внутреннее содержимое пластинки может сообщаться с окружающей тромбоцит плазмой. Каналы ОКС характеризует разный калибр трубочек; с вакуолями они соединены более тонкими трубочками [13]. В объемном отношении ОКС занимает около 4% от объема пластинки [14]. С функциональной точки зрения ОКС соединяет тром-

боцит с окружающей плазмой, реализует поглощение компонентов плазмы и перенос их внутрь пластинки: внутри тромбоцитов можно обнаружить вещества, которые добавляют в богатую тромбоцитами плазму [15]. Кроме насыщения тромбоцитов функционально необходимыми веществами, ОКС необходима и для процесса секреции содержимого гранул при активации тромбоцитов. Так мембраны α - и плотных гранул сливаются с ОКС или с цитоплазматической мембраной в ходе секреции, однако данный процесс реализуется и регулируется группой белков семейства SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) и VAMP (vesicle-associated membrane protein) [16–18]. В дополнении к биологической роли ОКС необходимо отметить и роль канальцев как резерва рецепторного аппарата тромбоцитов, связанного с реализацией гемостатической функции тромбоцитов. ОКС может быть и депо, местом хранения рецепторов адгезии, таких как интегрин α IIb β 3, GPIb/XI/V комплекс и GPVI; присутствуют они на поверхности цитоплазматической мембраны и внутри ОКС [15, 19]. Этим регуляторная роль ОКС в гемостатической функции тромбоцитов не исчерпана, это только индуцирующая направленность действия. Однако она может приводить и к подавлению агрегации, например, путем изменения количества рецепторов GPIb/XI/V, связанных с перемещением их во внутриклеточный пул ОКС [15].

Кроме вышесказанного, ОКС тромбоцитов исполняет роль депо субстратов для построения мембран при активации тромбоцитов. Общеизвестен факт, что при активации тромбоциты увеличиваются в размерах, перестают быть сферическими и морфологически претерпевают ряд изменений [20]. Данные морфологические перестройки и обеспечиваются, в основном, поглощением компонентов ОКС при активации пластинки. Так же важной структурой в тромбоците является плотная трубчатая система, которая является аналогом эндоплазматической сети мегакариоцита. С функциональной точки зрения, плотная тубулярная система является резервуаром для ионов Ca , а также задействована в обмене липидов, в синтезе эйкозаноидов – тромбоксанов [19,22].

Исполнение столь жизненно важных функций требует от кровяных пластинок соответствующего метаболического обеспечения. Все процессы активации, внутриклеточных перестроек, секреции, требуют высоких затрат энергии, пластического и регуляторного материала. Так, основными процессами, которые обеспечивают тромбоциты необходимой энергией, являются анаэробное окисление глюкозы и окислительное фосфорилирование. При этом базальный метаболизм субстратов для наработки энергии осуществим за счет анаэробного гликолиза [23]. Важно, что в тромбоцитах эффект Пастера, связанный с переключением метаболизма пирувата по аэробному пути в аэробных условиях, не является совершенным [24]. Иными словами, образование лактата из пирувата происходит даже в аэробных условиях. На первый взгляд, это может показаться необоснованным, энергетически невыгодным, однако по результатам работ авторов, при стимуляции тромбоцитов агонистами агрегации,

Виды гранул и состав кровяных пластинок

| α-гранулы |
|--|
| <p><i>Протеогликаны:</i> бета-TG (тромбоглобулин), PF4 (антигепариновый фактор тромбоцитов, фактор 4 тромбоцитов), серглицин, HRGP (богатый гиститином гликопротеин). <i>Хемокины:</i> RBP (тромбоцитарный основной белок), CTAP-III (пептид активации соединительной ткани), NAP-2 (пептид активации нейтрофилов), RANTES (CCL5) - Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted. <i>Адгезивные молекулы:</i> фибронектин, витронектин, фактор Виллебранда, тромбоспондин. <i>Факторы свертывания и кофакторы</i> – фибриноген, факторы V, VII, XI, XIII, кининогены, протеин S, плазминоген. <i>Клеточные митогены:</i> PDGF (Platelet-derived growth factor, фактор роста тромбоцитов), TGFβ (трансформирующий фактор роста), ECGF (фактор роста эндотелиальных клеток), EGF (фактор роста эпителия), VEGF/ VPF (фактор проницаемости сосудов), IGF (инсулиноподобный фактор роста), интерлейкин-β. <i>Ингибиторы протеиназ:</i> α-2-макроглобулин, α-2-антитрипсин, PDC1 (тромбоцитарный ингибитор коллагеназы), α-2-антиплазмин, PAI1 (ингибитор активатора плазминогена 1), TFPI (ингибитор пути тканевого фактора), α1-PI (α-1-протеиназный ингибитор), PIX1 (тромбоцитарный ингибитор фактора XIa), PN-2/APP Protease nexin-2), C1-inhibitor (ингибитор C1-эстеразы). <i>Разное:</i> иммуноглобулины G, A, M, альбумин, GPIa/Multimerin.</p> |
| Плотные гранулы |
| <p><i>Нуклеотиды:</i> адениновые - АТФ, АДФ; гуаниновые - ГТФ, ГДФ. <i>Амины:</i> серотонин, гистамин, катехоламины. <i>Ионы:</i> кальций, магний, пирофосфат.</p> |
| Лизосомы |
| <p><i>Кислые протеиназы:</i> катепсины D и A, карбоксипептидазы A и B, пролинкарбоксипептидаза, коллагеназа, кислая фосфатаза, арилсульфатаза. <i>Гликогидролазы:</i> гепариназа, β-N-ацетилглюкозаминидаза, β-N-ацетилгалактозаминидаза, β-глюкуронидаза, β-галактозидаза, β-глицерофосфатаза, α-D-глюкозидаза, β-D-глюкозидаза, α-L-фукозидаза, β-D-фукозидаза, α-L-арабинозидаза, α-D-маннозидаза.</p> |

наблюдали как активацию анаэробного окисления глюкозы, так и аэробного пути катаболизма глюкозы [25]. В связи с этим, физиологично необходимо охранять активность гликолитического расщепления глюкозы даже в присутствии кислорода. В этих же работах указано на неоднозначность преимущественного использования определенного метаболического пути обеспечения кровяной пластинки субстратами для наработки энергии; трудно сказать какой путь превалирует в процессе активации тромбоцитов. Не понятным является и то, идентичные ли биохимические изменения в клетках происходят при действии разных агонистов или нет. Показано, что разные агонисты стимулируют реакции образования энергии тромбоцитами по-разному: тромбин активирует ферменты, как гликолиза, так и процессы окислительного фосфорилирования; метаболизм арахидоновой кислоты и коллаген обеспечивает, в основном, окислительное фосфорилирование, но в меньшей степени, чем тромбин; коллаген же индуцирует повышение активности ключевых ферментов гликолиза [26]. Сделано заключение, что при активации тромбином происходит фосфорилирование P13K (phosphoinositide 3-kinase) и PRKB-B/Akt. P13K – фосфоинозитид-3-киназа это ключевой фермент P13K-сигнального пути, который регулирует метаболические процессы в клетках. Иной P13K-сигнальный путь так же ассоциирован с протеинкиназой B (PRKB-B); это следующее звено сигнального пути. Существует несколько изоформ PRKB-B, которые кодируют разные варианты гена Akt [27]. Активация всего каскада реакций метаболизма связана с АДФ-опосредованным влиянием связывания лиганда со специфичными рецепторами P2Y12. Фосфорилирование активно приводит к повышению внутриклеточной концентрации кальция и далее к фосфорилированию протеинов тромбоцитов [26]. При этом коллаген значительно активирует фосфорилирование P13K, в то же время, фосфорилирова-

ния акт при этом не происходит [26]. Таким образом, активация P13K усиливает тромбин-ассоциированные регуляторные процессы в тромбоцитах, обеспечивая секрецию α-гранул, участие в их адгезии и опосредует реализацию функционального процесса «снаружи-внутри» [29].

Другим участником тромбин-опосредованной активации тромбоцитов является киназа гликогенсинтазы-3 (GSK-3) [30]. Согласно последним данным, киназу гликогенсинтазы-3 рассматривают как отрицательный регулятор активации тромбоцитов при действии тромбина. Реализован этот процесс путем фосфорилирования протеинкиназой C и акт; это понижает активность и усиливает тромбин-ассоциированное действие тромбоцитов [31]. Показано, что GSK-3 имеет 2 изоформы α- и β-, при этом β-форма экспрессирована преимущественно в тромбоцитах [32]. Скорость фосфорилирования GSK-3 этими протеинкиназами не одинакова; более активно фосфорилирование усиливает протеинкиназа C, и менее выражено акт [31]. Таким образом, данные о взаимосвязи регуляции углеводного обмена в покоящихся и активированных тромбоцитах могут стать ключевыми с позиций объяснения фундаментальных основ обеспечения энергией главного, тромбоцитарного звена свертывающей системы. Это способствует появлению новых мишеней действия лекарственных средств в условиях повышенной или сниженной агрегационной способности тромбоцитов.

Состав липидов в тромбоцитах характеризует присутствие основных представителей данной группы соединений; среди них доминируют фосфо- и в меньшей мере гликолипиды, холестерин в форме полярного стерола, спирта, и в форме полиненасыщенных жирных кислот, которые этерифицированы спиртом холестерином. С исторической точки зрения в 1960-1980 гг. изучены основные липиды тромбоцитов, в дальнейшем выяснены закономерности из-

менений состава жирных кислот в тромбоцитах при алиментарной нагрузке разными жирами растительного и животного происхождения. Обусловлено это повышенным интересом исследователей к проблеме нарушений тромбоцитарного звена гемостаза на фоне роста числа пациентов с патологией сердечно-сосудистой системы. Далее последовало выяснение метаболизма жирных кислот и липидов, в частности, нарушения метаболизма полиненасыщенных жирных кислот и синтез эйкозаноидов. Завершилось это присуждением в 1982 г. Нобелевской премии Б. Самуэльсону, С. Бергстрёмому и Д. Вейну за работы о роли простагландинов и тромбоксанов в активации, в агрегации тромбоцитов.

Особое значение в метаболизме липидов в тромбоцитах имеет состав липидов в цитоплазматической мембране пластинок; она соответствует постулатам классической жидкостно-мозаичной модели строения мембран эукариотов, тем не менее, имеет имеются и характерные черты. Так, особенностью строения цитолеммы кровяных пластинок является ассиметричное расположение молекул глицеро- и сфингофосфолипидов в наружном и внутренних слоях у тромбоцитов в покое. Для этого состояния характерна преимущественная локализация фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола во внутреннем слое плазмолеммы; это регулирует прокоагулянтную активность кровяных пластинок [19, 33]. Во внешнем слое бислоидной мембраны расположены, главным образом, молекулы фосфатидилхолинов и сфингомиелинов [33]. Процесс смены ориентации липидов между наружным и внутренним листками цитолеммы поддерживает группа ферментов, именуемых как флоспаза, флиппаза и скремблаза. Флоспаза является продуктом гена АВСС и обеспечивает АТФ-зависимый перенос фосфолипидов, флиппаза – является так же АТФ-зависимой транслоказой, которая перемещает фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин во внутренний слой бислоидной цитоплазматической мембраны. Скремблаза обеспечивает неспецифичный перенос фосфолипидов при активации тромбоцитов, в то время как в это время, флоспаза и флиппаза ингибированы; процесс этот является энергонезависимым [34].

Можно с уверенностью сказать, что транслоказы обеспечивают необходимый состав фосфолипидов как на внешней стороне цитолеммы, так и во внутренней ее части, что критично в момент активации тромбоцита и последующей реорганизации фосфолипидных молекул в масштабах плазмалеммы. Получены данные о роли изменения состава фосфолипидного при действии транслоказ и скремблазы в процессах апоптоза, аутофагии, пролиферации и образования внеклеточных везикул тромбоцитов [35]. Регуляция активности этих ферментов связана с двумя аспектами. Флоспаза и флиппаза обеспечивают перенос фосфолипидов против градиента концентрации, в то время как активность скремблазы мало зависит от уровня макроэргических АТФ в клетке. Однако активность скремблазы, как основного звена в молекулярной смене фосфолипидов напрямую зависит от концентрации внутриклеточного Ca^{2+} : увеличение

содержания которого запускает процесс скремблинга фосфолипидов, а снижение – тормозит этот процесс [37].

В 2010 г. J.Suzuki и соавт. [38] выделен новый потенциальный регулятор скремблзной активности тромбоцитов в крови. Речь идет о белке TMEM16F (transmembrane protein 16-family)/аноктамин 6/ANO6; это белок-липидный домен, который является отдельным белком группы протеинов TMEM. Это семейство белков включает около 10 протеинов со множественными функциями в клетках. TMEM16F регулирует не только активность скремблазы тромбоцитов, но и функцию транспортных систем – преодоление мембраны тромбоцитов. В то же время, взаимоотношение этого действия применительно к одному протеому, выяснены не до конца [39]. Хотя авторы заключили, что аноктамин-6, в основном, функционирует как регулятор перемещение фосфолипидов в большей мере, отводя вторичную роль функция ионного транспортера вторична. Исследователи полагают, что процесс перемещения фосфолипидов между слоями бислоидной клеточной мембраны связан с образованием водных каналов для полярных головок фосфолипидов; именно это обеспечивает их движение в гидрофобных участках мембраны в процессе транслокации [40]. Молекулярные изменения, которые происходят в тромбоцитах у пациентов с синдромом Скотта, отражают биохимическую основу патологии. При этом недостаточная активности скремблазы тромбоцитов и других клеток *in vivo*, исключает возможность образования локальной структуры из анионов, в основном, из фосфатидилсеринов. Это «плацдарм» для дальнейших ферментативных превращений реакций коагуляции, что клинически проявляется в геморрагическом синдроме [41].

Другой важной составляющей цитоплазматической мембраны является полярная молекула спирта холестерина. Наиболее широко в масштабах плазматической мембраны полярный холестерин представлен в так называемых липидных плотях, рафтах, которые являются выражено гидрофобными микродоменами, локализованные в наружном и внутреннем монослое мембраны и обогащенные полярным холестерином, сфинголипидами и функционально активными протеинами [42]. Липидные плоты в клетках содержат большинство рецепторов, удерживают их в мембране, группируют рецепторы мембраны клеток, а также все регуляторные протеины, которые обеспечивают функцию рецепторов [43]. Специфические функции тромбоцитов так же связаны с активностью протеинов липидных плотей; рафты могут регулировать чувствительность тромбоцитов к ионам кальция [44], а также опосредуют взаимодействие интегрин с активным цитоскелетом пластинок [45].

Роль липидных плотей заключается в регулировании активности серин/треониновых фосфатаз, функции, которых связаны с активацией PAR1-рецепторов посредством тромбина [46]. Высока также чувствительность функциональных протеинов рафтов к агонистам, которая осуществима тоже посредством рецепторов. Действие всех агонистов и агонистов (CD36, GPIb, GPVI, P2Y12, TXA2) обусловлена

функцией липидных плотов; она нарушается при изменении выражено гидрофобной структуры липидных плотов в процессе изменения содержания холестерина в липидном микродомене при действии, в частности, метил- β -циклодекстрина [46-48]. Структурная организация плотов связана с некоторыми модификациями компонентов плота, например, их ацилированием. Слияние гранул и секреция их содержимого связано с функцией семейств белков SNARE, VAMP и синтаксином, необходимыми для единения мембран рафтов с цитоплазматической мембраной [49]. Показано, что регуляция этих процессов зависит от функции IкВ-киназы (IKK), которая регулирует фосфорилирование SNAP-23 (Synaptosome Associated Proteins) /синтаксин-11 [50]. Однако, не только фосфорилирование может регулировать функциональное состояние мембранных белков, но и их ацилирование - ковалентное присоединение ацильных цепей жирных кислот [51]. В тромбоцитах возможно пальмитоилирование белков, которое происходит ковалентно, обратимо и связано с образованием либо тиоэфирных связей по остаткам цистеина, либо с образованием амидной связи с остатками глицина или цистеина [52]. Так пальмитоилирование трансмембранных белков SNAP-23 и синтаксина происходит по причине нарушения последовательности аминокислотных остатков в расположении участков цепей богатых цистеином – 6 остатков цистеина в терминальном участке синтаксина-11, и 5 остатков цистеина характерно для SNAP-23 [51].

Реализовано ацилирование при действии фермента пальмитоилацилтрансферазы, которая представлена в тромбоцитах тремя изоформами. Многие и иные протеины подвергается ацилированию пальмитиновой кислотой, например, α -субъединица G-белка, гликопротеин Ib, аденилатциклаза и P-селектин [53]. Резюмируя выше сказанное, можно заключить, что пальмитоилирование белков тромбоцитов может играть роль индуктора активации и агрегации тромбоцитов [53]. Однако множество фактов остается не ясными; каково взаимодействие сигнальных путей активации кровяных пластинок друг с другом; места отдельных регуляторных каскадов в общей картине индукции адгезии и агрегации тромбоцитов, а также патофизиологические механизмы становления некоторых тромбоцитопатий.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 7, 9, 10, 12-19, 22, 23, 25-27, 29-46, 48-53 см. REFERENCES)

1. Луговская С.А., Почтарь М.Е. *Гематологический атлас*. М.-Тверь: Триада; 2016.
4. Леонтьев М.А., Родзаевская Е.Б., Масляков В.В., Мазуров А. В. *Морфология тромбоцитов новорожденных (обзор литературы). Физиология и патология тромбоцитов*. М.: Литтерра; 2011.
5. Козинец Г.И., Сарычева Т.Г., Луговская С.А., Дягилева О.А., Погорелов В.М., Проценко Д.Д. *Гематологический атлас: настольное руководство врача-лаборанта*. М.: Практическая медицина; 2015.
6. Тэмл Х., Харальд Д. *Атлас по гематологии. Практическое по-*

собие по морфологической и клинической диагностике. Харальд Тэмл, Хайнц Диа, Торстен Хаферлах. М.: МЕДпресс-информ; 2014.

8. Баркаган З.С., Момот А.П. *Основы диагностики нарушений гемостаза*. М.: Ньюдиамед-АО; 1999.
11. Сонис А.Г., Сефединова М.Ю., Безрукова М.А., Марченко А.А., Ладонин С.В. Применение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы в лечении пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей, костей и суставов. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2016; 5-6: 162-7.
20. Марковчин А.А. Физиологические особенности тромбоцитов. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; 6: 60-8.
21. Макаров М.С. Неканонические способы активации тромбоцитов человека. *Медицинский алфавит*. 2015; 3-11: 30-5.
24. Федоров Н.А., ред. *Нормальное кроветворение и его регуляция*. М.: Медицина; 1976.
28. Шатурный В.И., Шахиджанов С.С., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А. Активаторы, рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови. *Биомедицинская химия*. 2014; 60(2): 182-200.
47. Крутецкая З. И., Миленина Л. С., Наумова А. А., Бутов С. Н., Антонов В. Г., Ноздрачев А. Д. Метил- β -циклодекстрин модулирует в макрофагах депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый тапсигартином. *Доклады академии наук*. 2017; 473 (2): 222–4.

REFERENCES

1. Lugovskaya S.A., Pochtar' M.E. *Hematologic atlas [Gematologicheskij atlas]*. Moscow-Tver': Triada; 2016. (in Russian)
2. Michelson Alan D. *Platelets (3rd ed.)*. Foreword: A Brief History of Ideas. Academic Press; 2013: Pages xix-xliv, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387837-3.00069-9>.
3. Schmaier A.A., Stalker T.J., Runge J.J., Lee D., Nagaswami C., Mericko P. et al. Occlusive thrombi arise in mammals but not birds in response to arterial injury: evolutionary insight into human cardiovascular disease. *Blood*. 2011; Sep 29; 118(13):3661-9.
4. Leont'ev M.A., Rodzaevskaya E.B., Maslyakov V.V., Mazurov A. V. Platelet morphology of newborns (literature review). 2017. *Fiziologiya i patologiya trombocitov*. Moscow: Litterra; 2011. (in Russian)
5. Kozinets G.I., Sarycheva T.G., Lugovskaya S.A., Dyagileva O.A., Pogorelov V.M., Procenko D.D. *Hematologic Atlas: the laboratory's laboratory manual*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2015. (in Russian)
6. Tehml H., Haral'd D. Hematology Atlas. Practical manual on the morphological and clinical diagnosis. / Haral'd Tehml, Hajnc Dia, Torsten Haferlah. Moscow: MEDpress-inform; 2014. (in Russian)
7. Jesse W. Rowley, Andrew S. Weyrich. Ribosomes in platelets protect the messenger. 2017 Apr 27;129(17):2343-45.
8. Barkagan Z.S., Momot A.P. *Basics of diagnosis of hemostatic disorders [Osnovy diagnostiki narusheniy gemostaza]*. Moscow: N'yudiamed-AO; 1999. (in Russian)
9. Heijnen H., van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J. Thromb. Haemost.* 2015; Dec;13(12):2141-51.
10. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 2009; Jul;23(4): 177-89.
11. Sonis A.G., Sefedinova M.YU., Bezrukova M.A., Marchenko A.A., Ladonin S.V. The use of autoplasm enriched with platelets in the treatment of patients with purulent-inflammatory diseases of soft tissues, bones and joints. *Aspirantskiy vestnik Povolzh'ya*. 2016; 5-6: 162-7. (in Russian)
12. Rendu F., Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001; Aug;12(5): 261-73.
13. van Nispen tot Pannerden H., de Haas F., Geerts W., Posthuma G., van Dijk S., Heijnen H.F. The platelet interior revisited: Electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. *Blood*. 2010; Aug 19;116(7): 1147-56.
14. Mountford J.K., Petitjean C., Putra H.W., McCafferty J.A., Setia-bakti N.M., Lee H., et al. The class II PI 3-kinase, PI3KC2alpha, links platelet internal membrane structure to shear-dependent adhesive function. *Nat. Commun.* 2015; Mar 17;6: 6535.

15. Maria V. Selvadurai & Justin R. Hamilton. Structure and function of the open canalicular system – the platelet’s specialized internal membrane network. *Platelets*. 2018; Jun;29(4): 319-25.
16. Koseoglu S., Peters C.G., Fitch-Tewfik J.L., Aisiku O., Danglot L., Galli T. et al. VAMP-7 links granule exocytosis to actin reorganization during platelet activation. *Blood*. 2015; Jul 30;126(5): 651-60.
17. Peters C.G., Michelson A.D., Flaumenhaft R. Granule exocytosis is required for platelet spreading: differential sorting of α -granules expressing VAMP-7. *Blood*. 2012; Jul 5;120(1): 199-206.
18. Ren Q.L., Barber H.K., Crawford G.L., Karim Z.A., Zhao C., Choi W. et al. Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction. *Mol. Biol. Cell*. 2007; Jan;18(1): 24-33.
19. Paolo Gresele, Gustav V.R. Born, Carlo Patrono, Clive P. Page. *Antiplatelet Agents* Springer; 2010.
20. Markovchin A.A. Physiological features of platelets. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; 6: 60-8. (in Russian)
21. Makarov M.S. Non-canonical methods for activating human platelets. *Meditsinskiy alfavit*. 2015; 3 (11): 30-5. (in Russian)
22. Hartwig J.H. The platelet: Form and function. *Semin Hematol*. 2006; 43(1 Suppl 1):S94–100.
23. Kramer P.A., Ravi S., Chacko B., Johnson M.S., Darley-Usmar V.M. A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes: implications for their use as bioenergetics biomarkers. *Redox Biol*. 2014; Jan 10; 2: 206-10.
24. Fedorov N.A., ed. Normal blood formation and its regulation. Moscow: Meditsina; 1976. (in Russian)
25. Ravi S., Chacko B., Sawada H., Kramer P.A., Johnson M.S., Benavides G.A., et al. Metabolic Plasticity in Resting and Thrombin Activated Platelets. *PLoS ONE*. 2015; 10(4): e0123597.
26. Coronade la Peña N., Gutierrez-Aguilar M., Hernandez-Resendiz I, Mariñ-Hernandez A, Rodríguez-Enríquez S. Glycoprotein Ib activation by thrombin stimulates the energy metabolism in human platelets. *PLoS One*. 2017; Aug 17; 12(8): e0182374.
27. Guidetti G.F., Canobbio I., Torti M. PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis. *Adv. Biol Regul*. 2015; Sep; 59: 36-52.
28. Shaturnyj V.I., SHahidzhanov S.S., Sveshnikova A.N., Pantelev M.A. Activators, receptors and pathways of intracellular signaling in blood platelets. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2014; 60 (2): 182-200. (in Russian)
29. Estevez B., Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda)*. 2017; Mar; 32(2): 162-77.
30. Barry F. A., Graham G. J., Fry M. J., Gibbins J. M. Regulation of glycogensynthase kinase3 in human platelets: a possible role in platelet function? *FEBS Lett*. 2003; 553: 173–8.
31. Moore S.F., van den Bosch M.T., Hunter R.W., Sakamoto K., Poole A.W., Hers I. Dual regulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) α/β by protein kinase C (PKC) α and Akt promotes thrombin-mediated integrin α IIb β 3 activation and granule secretion in platelets. *J. Biol. Chem*. 2013; Feb 8; 288(6): 3918-28.
32. Li D., August S., Woulfe D. S. GSK3 β is a negative regulator of platelet function and thrombosis. *Blood*. 2008; Apr 1; 111(7): 3522-30.
33. O’Donnell V.B., Murphy R.C., Watson S.P. Platelet lipidomics: modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets. *Circ. Res*. 2014; Mar 28; 114(7):1185-203.
34. Nagata S., Suzuki J., Segawa K., Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death. Differ*. 2016; Jun; 23(6): 952-61.
35. Segawa K., Nagata S. An Apoptotic ‘EatMe’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol*. 2015; 25(11): 639-50.
36. Boilard E., Ducheze A.C., Brisson A. The diversity of platelet microparticles. *Curr. Opin. Hematol*. 2015; Sep; 22(5): 437-44..
37. Bevers E.M., Williamson P.L. Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett*. 2010; Jul 2; 584(13): 2724-30.
38. Suzuki J., Umeda M., Sims P.J., Nagata S. Calcium - dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*. 2010; Dec 9; 468(7325):
39. Scudieri P., Caci E., Venturini A., Sondo E., Pianigiani G., Marchetti C. et al. Ion channel and lipid scramblase activity associated with expression of TMEM16F/ANO6 isoforms. *J. Physiol*. 2015; Sep 1; 593(17): 3829-48.
40. Yu K., Whitlock J.M., Lee K., Ortlund E.A., Cui Y.Y., Hartzell H.C. Identification of a lipid scrambling domain in ANO6/TMEM16F. *Elife*. 2015; Jun 9; 4: e06901.
41. Solari F.A., Mattheij N.J., Burkhart J.M., Swieringa F., Collins P.W., Cosemans J.M. et al. Combined Quantification of the Global Proteome, Phosphoproteome, and Proteolytic Cleavage to Characterize Altered Platelet Functions in the Human Scott Syndrome. *Mol. Cell Proteomics*. 2016; Oct;15(10): 3154-69.
42. Gousset K., Wolkers W.F., Tsvetkova N.M., Oliver A.E., Field C.L., Walker N.J. et al. Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets. *J. Cell. Physiol*. 2002; Jan; 190(1): 117-28.
43. Ohtsuka H, Iguchi T, Hayashi M, Kaneda M, Iida K, Shimonaka M et al. SDF-1 α /CXCR4 Signaling in Lipid Rafts Induces Platelet Aggregation via PI3 Kinase-Dependent Akt Phosphorylation. *PLoS One*. 2017; Jan 10; 12(1): e0169609.
44. Dionisio N., Galán C., Jardín I., Salido G.M., Rosado J.A. Lipid rafts are essential for the regulation of SOCE by plasma membrane resident STIM1 in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; Mar;1813(3): 431-7.
45. Bodin S., Soulet C., Tronchère H., Sié P., Gachet C., Plantavid M. et al. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. *J. Cell Sci*. 2005; Feb 15;118(Pt 4):759-69.
46. Pradhan S., Vijayan K.V. Lipid rafts contribute to agonist-induced serine/threonine phosphatase activation and platelet aggregation. *J.Thromb. Haemost*. 2013; Aug;11(8):1612-5.
47. Krutetskaya Z. I., Milenina L. S., Naumova A. A., Butov S. N., Antonov V. G., Nozdrachev A. D. Methyl- β -cyclodextrin modulates in macrophages the deposit-dependent Ca²⁺ input induced by taspigargin. *Doklady akademii nauk*. 2017; 473 (2): 222–4. (in Russian)
48. Moscardó A., Vallés J., Latorre A., Santos M.T. The association of thromboxane A2 receptor with lipid rafts is a determinant for platelet functional responses. *FEBS Lett*. ; Aug 25;588(17): 3154-9.
49. Golebiewska E.M., Harper M.T., Williams C.M., Savage J.S., Goggs R., Fischer von Mollard G et al. Syntaxin 8 regulates platelet dense granule secretion, aggregation, and thrombus stability. *J. Biol. Chem*. 2015; Jan 16; 290(3): 1536-45.
50. Joshi S., Whiteheart S.W. The nuts and bolts of the platelet release reaction. *Platelets*. 2017; Mar; 28(2):129-37.
51. Zhang J., Huang Y., Chen J., Zhu H., Whiteheart S.W. Dynamic cycling of t-SNARE acylation regulates platelet exocytosis. *J. Biol. Chem*. 2018; Mar 9; 293(10): 3593-3606.
52. Nadolski M.J., Linder M.E. Protein lipidation. *FEBS J*. 2007; Oct;274(20): 5202-10.
53. Sim D.S., Dilks J.R., Flaumenhaft R. Platelets possess and require an active protein palmitoylation pathway for agonist-mediated activation and in vivo thrombus formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2007; Jun;27(6): 1478- 85.

Поступила 16.03.19

Принята к печати 20.03.19

Гусьякова О.А., Гильмиярова Ф.Н., Кузьмичева В.И., Ерещенко А.А., Потякина Е.Е., Мурский С.И.,
Бородин И.А., Васильева Т.В., Гильмияров Э.М., Магсумова О.А., Халиулин А.В., Арчибасова О.В.

ОСОБЕННОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КОАГУЛОГРАММЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ АНТИГЕННОГО СОСТАВА ГРУППЫ КРОВИ ПО СИСТЕМЕ АВ0

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

Поддержание нормального тока крови по сосудам является результатом слаженной работы свертывающей и противосвертывающей систем нашего организма. Баланс этой системы зависит от многих факторов, в том числе эндотелиальных, гуморальных, тромбоцитарных, однако, мало известно о влиянии антигенных детерминант на состояние системы гемостаза. Данное исследование посвящено оценке влияния наличия и отсутствия антигенов по системе АВ0, презентированных на мембранах эритроцитов и тромбоцитов, на показатели коагулограммы. На базе ФГБОУ ВО Клиник СамГМУ проведено исследование 127 клинически здоровых лиц, которым были выполнены общий анализ и биохимическое исследование крови, у 51 человека с наиболее стабильными показателями клеточного состава и метаболического профиля были определены основные параметры коагулограммы, которые включали в себя определение активности факторов свертывания и скрининговых гемостазиологических тестов. Выявили достоверное уменьшение активности VIII и VII факторов свертывания, а также увеличение протромбинового времени у лиц с 0 (I) группой крови по сравнению с «антигенными» группами крови. Отметим наличие биологической вариации для показателей внешнего и внутреннего путей свертывания в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0. Полученные данные свидетельствуют о повышенной предрасположенности к кровотечениям пациентов 0 (I) группы крови в виду отсутствия антигенных детерминант на мембране клеток, в то время как для «антигенных» групп крови, напротив, выявляется предрасположенность к тромбозу вследствие повышенной активности компонентов свертывающей системы.

Ключевые слова: система АВ0; гемостаз; коагулограмма; антигены А и В.

Для цитирования: Гусьякова О.А., Гильмиярова Ф.Н., Кузьмичева В.И., Ерещенко А.А., Потякина Е.Е., Мурский С.И., Бородин И.А., Васильева Т.В., Гильмияров Э.М., Магсумова О.А., Халиулин А.В., Арчибасова О.В. Особенности показателей коагулограммы в зависимости от антигенного состава группы крови по системе АВ0. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (3): 170-175. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-170-175>

Gusyakova O.A., Gilmiyarova F.N., Kuzmicheva V.I., Ereshchenko A.A., Potyakina E.E., Murskiy S.I., Borodina I.A., Vasileva T.V., Gilmiyarov E.M., Magsumova O.A., Khaliulin A.V., Archibasova O.V.

COAGULATION TEST FEATURES DEPENDING ON THE AB0-BLOOD GROUPS SYSTEM ANTIGENIC COMPOSITION

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

The maintenance of normal blood flow through the vessels is the result of the coordinated work of the coagulation and anticoagulation systems of our body. The balance of this system depends on many factors, including endothelial, humoral, platelet ones, however, we still lack knowledge about the effect of antigenic determinants on the state of the hemostatic system. This study is devoted to assessing the effect of the presence and absence of antigens on the AB0 system, presented on erythrocyte and platelet membranes, on hemostatic parameters. The study was conducted in the Clinics of Samara State Medical University and consisted of 127 clinically healthy individuals who underwent a general analysis and biochemical blood analysis, 52 people with the most stable indicators of cell composition and metabolic profile were selected for a coagulation test, including determination of the activity of coagulation factors and routine tests. A significant decrease in the activity of the VIII and VII coagulation factors was revealed, as well as an increase in the prothrombin time in patients with 0 (I) blood group compared to the "antigenic" blood groups. The presence of biological variation for indicators of external and internal coagulation paths was noted, depending on the group of blood belonging to the AB0 system. The findings suggest that there is an increased susceptibility to bleeding in patients with 0 (I) blood groups due to the absence of antigenic determinants on the cell membrane, while for "antigenic" blood groups, on the contrary, there is a susceptibility to thrombosis due to increased activity of the components of the coagulation system.

Key words: AB0 blood system, hemostasis, coagulation test, antigens A and B.

For citation: Gusyakova O.A., Gilmiyarova F.N., Kuzmicheva V.I., Ereshchenko A.A., Potyakina E.E., Murskiy S.I., Borodina I.A., Vasileva T.V., Gilmiyarov E.M., Magsumova O.A., Khaliulin A.V., Archibasova O.V. Coagulation test features depending on the AB0-blood groups system antigenic composition. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (3): 170-175 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-170-175>

For correspondence: Ereshchenko A.A., assistant of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics; e-mail: bio-sam@yandex.ru

Information about authors:

Gusyakova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5619-4583>

Gilmiyarova F.N., <http://orcid.org/0000-0001-5992-3609>

Ereshchenko A.A., <https://orcid.org/0000-0002-4221-4440>

Murskiy S.I., <https://orcid.org/0000-0002-2550-6601>

Potyakina E.E., <https://orcid.org/0000-0002-1382-1831>

Borodina I.A., <https://orcid.org/0000-0001-7115-6430>

Vasileva T.V., <https://orcid.org/0000-0002-3384-4037>

Gilmiyarov E.M., <https://orcid.org/0000-0003-4761-4379>
Magsumova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-0511-6550>

Khaliulin A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4689-8904>
Archibasova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3733-8251>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 20.12.2018
Accepted 23.03.2019

Введение. Система гемостаза представляет собой сложную многокомпонентную морфофункциональную систему, принимающая участие с одной стороны – в обеспечении сохранения крови в сосудистом русле в жидком агрегатном состоянии и с другой – в остановке кровотечения при повреждении сосуда и в предотвращении кровопотери. Элементы системы гемостаза также участвуют в таких важных процессах жизнедеятельности, как воспаление [1], репарация тканей, поддержание гомеостаза и др. [2]. Нарушения процессов свертывания крови могут являться как самостоятельной нозологической единицей (гемофилии А и В, болезнь Виллебранда [3]), так и симптомом, причиной или следствием других патологических состояний [4]: ДВС-синдром при сепсисе, травмах и онкологических заболеваниях [5], тромбозы при гипергомоцистеинемии [6] и антифосфолипидном синдроме [7], кровотечения при печеночной недостаточности [8] и др.

Активность разных компонентов системы гемостаза может изменяться в широких пределах из-за генетических особенностей. В литературе имеются данные о взаимосвязи предрасположенности к типовым нарушениям гемостаза (гипер- и гипокоагуляции) в зависимости от групповой принадлежности крови [9]. Так, наличие взаимосвязи между системой АВ0 и развитием таких патологий как ишемическая болезнь сердца, инсульт, венозные тромбозы отчасти объясняются регуляторным воздействием агглютиногенов А и В на активность VIII фактора и фактора Виллебранда [10]. Также есть информация о том, что у представителей различных по системе АВ0 групп крови одно и то же заболевание, связанное с нарушением свертывания крови, может протекать неодинаково и характеризоваться разной степенью возникших осложнений [11,12]. Известным является и тот факт, что на поверхности тромбоцитов – ключевых клеточных компонентов гемостаза – помимо антигенов систем HPL и HLA расположены и антигенные детерминанты системы АВ0. Выявлены и группоспецифические особенности степени выраженности антигенных АВ0 детерминант на мембранах тромбоцитов в зависимости от группы крови и даже типа подгруппы [13]. Доказано наличие зависимости между количеством, морфо-функциональными характеристиками, полиморфизмом тромбоцитспецифических антигенов и системой АВ0. Группоспецифические особенности агрегантной активности тромбоцитов могут быть использованы при индивидуальном подборе дезагрегантной терапии у пациентов, перенесших чрескожное коронарное вмешательство [14].

Поскольку агглютиногенам А и В принадлежит

ведущая роль в формировании группы крови по системе АВ0, их наличие или отсутствие будет обуславливать группоспецифические особенности системы гемостаза. С этой точки зрения группы крови можно разделить на «безантигенные» («нулевые») – к ним относится 0(I) группа крови и «антигенные» («ненулевые») – А(II), В(III), АВ(IV) группы крови [14].

Цель исследования. Сравнить показатели коагулограммы у лиц с 0(I), А(II), В(III), АВ(IV) группами крови.

Материал и методы. Исследование проводилось на базе кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», клинико-диагностической лаборатории Клиник Самарского государственного медицинского университета. В исследовании принимало участие 127 клинически здоровых лиц, что подтверждалось отсутствием острых и хронических инфекционных и соматических заболеваний, отсутствием гематологических заболеваний в анамнезе (рис. 1). У всех участников перед началом исследования было получено добровольное информированное согласие. Средний возраст участников составил $19,8 \pm 0,5$ лет. Данной группе были проведены определение группы крови по системе АВ0, общий и биохимический анализы крови. Из 127 обследуемых были отобраны 51 человек для дальнейшего исследования показателей системы гемостаза. Критериями исключения являлись: наличие синдромов анемии и тромбоцитопении, заболеваний системы крови, беременность, приём препаратов, влияющих на систему гемостаза (НПВС, КОКи, антиагреганты, антикоагулянты и др.), любое отклонение от референтных значений в клиническом и биохимическом анализе крови.

Материалом для исследования являлась венозная кровь, полученная путём венепункции локтевой вены, собранная в пробирки для взятия крови фирмы «VACUTANER» (США). Для определения групповой принадлежности по системе АВ0 и показателей общего анализа крови использовали ЭДТА-стабилизированную кровь, сыворотку крови для определения метаболического статуса, цитратную кровь (3,2% раствора цитрата натрия) для определения показателей системы гемостаза. Определение групповой принадлежности крови по системе АВ0 осуществлялось перекрёстным методом с использованием моноклональных антител эритрогест-целиклоны анти-А, анти-В ООО «Гематолог» и набора стандартных эритроцитов 0(I), А(II), В(III) групп производства ГБУЗ «Самарская областная клиническая станция переливания крови». Определение показателей общего анализа крови проводилось на автоматическом ге-

Таблица 1

Показатели внешнего и общего путей свертывания в зависимости от наличия и отсутствия антигенных детерминант по системе АВ0 (M±m)

| Параметры | 0 (I) группа крови | 95% доверительный интервал | «Антигенные» группы крови | 95% доверительный интервал | Критерий Стьюдента, <i>p</i> | Критерий Манна-Уитни, <i>p</i> |
|--------------------------|--------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Протром-биновое время, с | 15,32±0,25 | 14,72-15,89 | 14,81±0,11 | 14,6-15,03 | 0,033 | 0,0709 |
| II фактор, % | 92,29±3,22 | 84,34-99,35 | 95,19±3,05 | 89-101,37 | 0,5902 | 0,1604 |
| VII фактор, % | 83,79±5,18 | 72,91-96,78 | 97,03±3,13 | 90,68-103,37 | 0,032 | 0,033 |
| X фактор, % | 82,14±4,09 | 72,02-91,06 | 86,92±2,16 | 82,54-91,29 | 0,2736 | 0,3212 |

Таблица 2

Показатели внутреннего пути свертывания в зависимости от наличия и отсутствия антигенных детерминант по системе АВ0 (M±m)

| Параметры | 0 (I) группа крови | 95% доверительный интервал | «Антигенные» группы крови | 95% доверительный интервал | Критерий Стьюдента, <i>p</i> | Критерий Манна-Уитни, <i>p</i> |
|----------------|--------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| VIII фактор, % | 66,97±6,14 | 51,29-77,33 | 93,54±5,04 | 83,32-103,77 | 0,005 | 0,0083 |
| IX фактор, % | 97,17±6,18 | 85,53-112,9 | 88,12±2,59 | 82,85-93,39 | 0,1184 | 0,277 |
| XI фактор, % | 123,71±4,51 | 112,62-134,99 | 118,41±4,85 | 108,56-128,25 | 0,4536 | 0,4276 |
| XII фактор, % | 115,21±5,89 | 101,08-128,76 | 118,73±7,18 | 104,28-133,28 | 0,5197 | 0,7067 |
| АЧТВ, с | 35,51±0,62 | 34,12-37,02 | 34,94±0,52 | 33,89-35,99 | 0,5392 | 0,4473 |

матологическом 5 diff анализаторе CELL-DYN Ruby. Метаболический статус (основные показатели углеводного, белкового, липидного, водно-минерального обменов) определяли на автоматическом биохимическом анализаторе COBAS-INTEGRA 400plus (Roche-Diagnostics, Швейцария).

Исследовали следующие показатели гемостаза: факторы свертывания (II, VII, VIII, IX, X, XI, XII), АЧТВ, протромбиновое время, пламиноген, антиплазмин, антитромбин III, протеин С. Активность факторов свертывания, АЧТВ, протромбиновое время определяли клоттинговым методом на автоматическом гемостазиологическом анализаторе STA COMPACT (Roche-Diagnostics, Швейцария). Данный метод основан на измерении промежутка времени с момента внесения реагента до образования фибринового сгустка. Активность протеина С, пламиногена, антиплазмина, антитромбина III определяли с использованием хромогенного метода на автоматическом гемостазиологическом анализаторе STA COMPACT (Roche-Diagnostics, Швейцария). Суть метода заключается в образовании окрашенного комплекса, концентрация которого прямо пропорциональна содержанию аналита в исследуемой плазме. Интенсивность окрашивания регистрируется фотометрически.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 23. Для признаков, имеющих нормальное распределение, были представлены средние (M), ошибка среднего (m) и 95% доверительный интервал. Нормальность распределения оценивалась с использованием теста Колмогорова-Смирнова. Межгрупповые сравнения проводились с использованием теста Стьюдента и Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Распределение показателей внешнего и общего путей свертывания имели следующие тенденции (табл. 1): проконвертин (VII фактор) преобладает среди «ненулевых групп»

- 83,79±5,18%, превосходя средние значения обладателей 0 (I) группы крови на 15,8 %. Фактор Стоурга-Прауэра (X фактор), который служит мишенью таким сериновым протеазам как фактор VIIa и фактор IXa, также увеличен в «ненулевых» группах крови – 86,92±2,16% по сравнению с 0 (I) группой крови. – 82,14±4,09%. Протромбин (II фактор) характеризуется более высокими значениями для «ненулевых» групп - 95,19±3,05% в сравнении с показателями для 0 (I) группой крови – 92,29 ±3,22 %.

Отметим, что перечисленные выше факторы - II, VII, X преобладают у носителей группы крови А (II), В (III), АВ (IV) и являются зависимыми от витамина К, который обеспечивает посттрансляционные перестройки путем гамма-карбоксилирования. Включение гамма-карбоксильных групп необходимо для взаимодействия с активными группами тромбопластина, несущими отрицательный заряд [15]. При дефиците витамина К могут формироваться неполноценные молекулы протромбина, теряющие способность к выполнению своих функций, которые получили названия белки PIVKA [16]. Предположительно, обладатели «ненулевых» групп крови имеют более высокий уровень синтетических процессов в печени, что подтверждается содержанием витамин-К зависимых факторов.

Показатель протромбинового времени, который также является тестом определяющим активность системы внешнего пути свертывания и фактора VII в частности, выше у лиц, имеющих 0 (I) группу крови – 15,32 ±0,25 с, в то время как для «ненулевых» групп этот показатель составил 14,81 ±0,11 с. Полученные данные свидетельствуют о снижении активности протромбинового комплекса среди лиц с 0 (I) группой крови, что может являться причинами развития некоторых гипокоагуляционных состояний.

Показатели внутреннего пути свертывания в зависимости от наличия или отсутствия антигенных детерминант по системе АВ0 представлены в табл. 2.

Показатели антикоагулянтной системы крови и системы фибринолиза в зависимости от наличия и отсутствия антигенных детерминант по системе АВ0 (M±m)

| Параметры | 0 (I) группа крови | 95% доверительный интервал | «Антигенные» группы крови | 95% доверительный интервал | Критерий Стьюдента, <i>p</i> | Критерий Манна Уитни, <i>p</i> |
|--------------------|--------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Плазминоген, % | 107,38±2,79 | 102,03-114,49 | 105,08±1,99 | 101,05-109,12 | 0,5340 | 0,2723 |
| Антиплазмин, % | 99,36±5,08 | 91,07-112,32 | 95,51±2,44 | 90,56-100,46 | 0,4487 | 0,4347 |
| Протеин С, % | 104,29±8,18 | 87,65-124,96 | 101,27±2,66 | 95,88-106,66 | 0,7305 | 0,7040 |
| Антитромбин III, % | 97,74±1,95 | 93,64-102,64 | 99,94±1,43 | 97,04-102,84 | 0,4066 | 0,3926 |

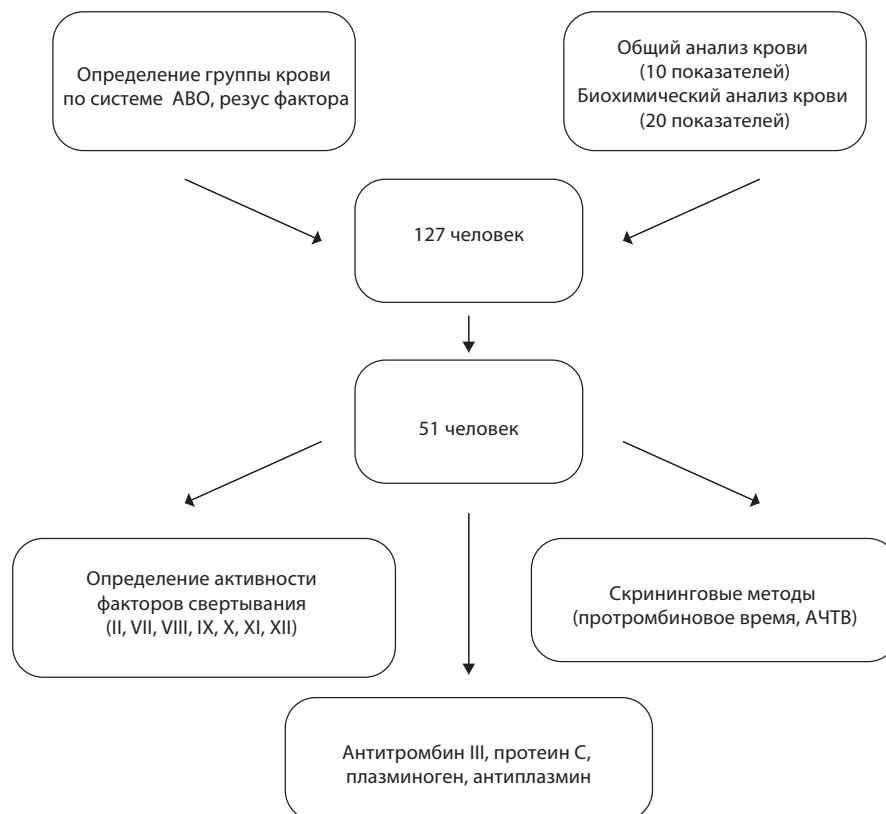


Рис. 1. Дизайн исследования.

Обращает на себя внимание, что наибольшие различия между сравниваемыми группами были зарегистрированы по VIII фактору: его активность была снижена на 39,7% среди лиц с 0 (I) группой крови и составила 66,97±6,14% по сравнению с «ненулевыми» группами – 93,54±5,04%. Полученный результат объясняется тем, что содержание фактора VIII и FWB зависит от групповой принадлежности крови по системе АВ0. По данным N.L.Smith и соавт. [17], проведенный геномный анализ показал, что однонуклеотидный полиморфизм, отвечающий за концентрацию названных факторов расположен в геномном локусе, кодирующем группы крови АВ0. Однако, вопрос о том, оказывают ли антигены АВ0 системы прямое или опосредованное влияние все еще остается обсуждаемым. В отношении FWB известно, что некоторые из его N- и O- участков гликозилирования подвергаются модификациям посредством антигенов АВ0,

также известны три O-гликана прямо связывающиеся с антигенными детерминантами, что вызывает в молекулах посттрансляционные изменения [18]. Вероятно поэтому, обладатели 0 (I) группы крови, клетки крови которых не содержат антигенных структур АВ0 системы, имеют значительно меньшие концентрации этих факторов.

Интересно отметить, что расовая принадлежность мало влияет на активность VIII фактора в 0 (I) группе крови, недавнее исследование, проведенное Z.Wang и соавт. [19], выявило достоверные различия в активности фактора между 0 (I) и «ненулевыми» группами, которое согласовывается с полученными нами результатами.

В то же время, фактор Кристмаса (IX фактор), напротив, выше у обладателей 0 (I) группы крови -97±6,18% по сравнению с обладателями групп крови, содержащие антигены (А (II), В (III), АВ (IV)) -88,12±2,59%. Актив-

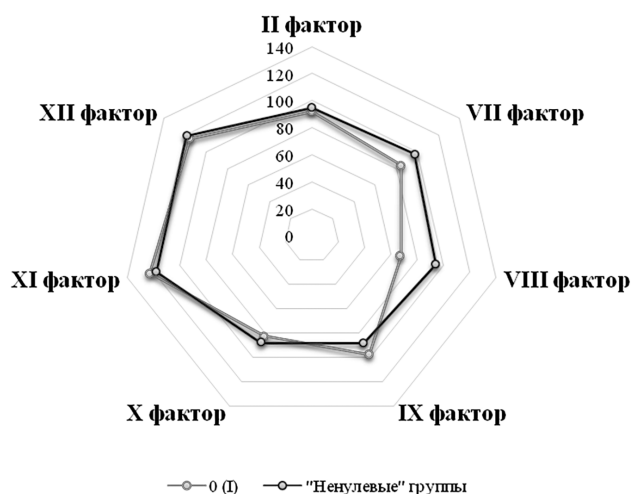


Рис. 2. Содержание основных факторов свертывания в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0.

ность XI и XII факторов оказалась сопоставимой для обеих сравниваемых групп. Для показателя активированного частичного тромбопластинового времени, который является рутинным тестом для оценки внутреннего пути свертывания, также была выявлена небольшая вариация.

Показатели антикоагулянтной и фибринолитической систем крови в зависимости от наличия или отсутствия антигенных детерминант по системе АВ0 представлены в табл. 3.

В ходе анализа статистических данных, полученных при обработке параметров антикоагулянтной и фибринолитической систем крови, не было выявлено достоверных закономерностей, однако отмечена разнонаправленная тенденция к изменению активности естественных антикоагулянтов в зависимости от наличия и отсутствия антигенных детерминант по системе АВ0: активность протеина С выше в 0(I) группе крови и составляет $104,29 \pm 8,18\%$, в то время как значение активности антитромбина III в «ненулевых» группах крови ($99,94 \pm 1,43\%$) превосходит таковое в 0(I) группе крови ($97,74 \pm 1,95\%$). При этом следует отметить, что показатель системы фибринолиза плазминоген выше в 0(I) группе крови и составляет $107,38 \pm 2,79\%$. Аналогичная закономерность наблюдается при оценке активности ингибитора фибринолиза антиплазмина, значение которой также выше в 0(I) группе крови ($99,36 \pm 5,08\%$).

Заключение. Приведенные данные свидетельствуют о наличии биологической вариации гемостазиологических показателей крови, что проявляется в изменении содержания ряда факторов свертывания (рис. 2).

Так, было выявлено наличие сильной зависимости между активностью VIII фактора и присутствием антигенов А и В на поверхности мембран эритроцитов и тромбоцитов. Кроме того, отметили снижение активности тромбин-зависимых факторов (II, VII, IX) свертывания в 0 (I) группе, что также связываем с отсутствием антигенных детерминант у обладате-

лей данной группы крови. Полученные данные свидетельствуют о сниженной предрасположенности к венозным тромбозам пациентов 0 (I) группы крови, в то время как для «антигенных» групп крови, напротив, выявляется предрасположенность к тромбозам вследствие повышенной активности компонентов свертывающей системы.

Поскольку референсные интервалы для лабораторных тестов определяют при исследовании здоровых лиц [20], а некоторые методики исследования параметров коагулограммы до сих пор не унифицированы [21], врачи, как правило, не имеют четких границ нормальных показателей гемостаза. Многие компоненты системы гемостаза лабильны, а на результаты анализа влияет целый ряд факторов. Поэтому при исследовании свертывающей системы крови особенно необходим персонализированный подход для решения вопроса о диагнозе и тактике лечения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Свиридова С.П., Сомонова О.В., Кашия Ш.Р., Обухова О.А., Сотников А.В. Роль тромбоцитов в воспалении и иммунитете. *Исследования и практика в медицине*. 2018; 5(3): 40-52.
2. Бушуева Н.А., Воробьева Н.А. Характеристика системы гемостаза при физических нагрузках (обзор). *Журнал медико-биологических исследований*. 2015; 2: 62-70.
3. Колосков А.В. Болезнь Виллебранда. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2017; 19(11): 43-8.
4. Розина Т.П., Фастовец С.В., Старостина Е.Е., Самоходская Л.М., Краснова Т.Н. Значение аллельных вариантов генов системы свертывания крови и тромбоцитарных рецепторов в развитии болезни Вильсона-Коновалова. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2018; 28(2): 50-5.
5. Кубышкин А.В., Пылаева Н.Ю., Фомочкина И.И., Писарев А.А. Травма, гемостаз и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания: патогенетические механизмы нарушений гемокоагуляции. *Клиническая патофизиология*. 2016; 22(4): 104-17.
6. Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Боровик Т.Э., Бушуева Т.В., Глоба О.В., Журкова Н.В. и др. Гомоцистинурия у детей. *Вопросы современной педиатрии*. 2017; 16(6): 457-67.
7. Стулева Н.С., Хизроева Д.Х., Машкова Т.Я., Абрамян Г.Р. Циркуляция антифосфолипидных антител и неудачи ЭКО. *Акушерство, гинекология и репродукция*. 2015; 9(3): 6-10.
8. Магомедов М.М., Иманалиев М.Р., Магомедов Х.М. Особенности системы гемостаза и маркеры системной воспалительной реакции у пациентов при механической желтухе, осложненной печеночной недостаточностью. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2018; 20(6): 59-63.
9. Гергесова Е.Е., Витковский Ю.А., Солпов А.В. Агрегация тромбоцитов, лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия и группы крови АВ0 у больных гриппом А (H1N1). *Забайкальский медицинский вестник*. 2011; 1: 4-9.
11. Косякова Ю.А., Давыдкин И.Л., Степанова Т.Ю., Куртов И.В., Кудинова Н.А. Оценка синдрома анемии при гемофилии. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2010; 4: 258-9.
12. Косякова Ю.А. Биохимические показатели крови у больных гемофилией. *Казанский медицинский журнал*. 2013; 94(5): 707-10.
15. Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Козлов А.А. Внешний путь свертывания крови. Методы исследования. Методическое руководство. М.: РЕНАМ; 2017.
20. Петрова О.В., Уртаева З.А., Шашин С.А., Тарасов Д.Г. Рефе-

рентные интервалы показателей системы гемостаза у взрослого населения Астраханской области при применении автоматического коагулометра «Sta Compact». *Медицинский вестник Юга России*. 2016; 2: 63-6.

21. Козлов А.А., Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В. Преаналитический этап в гемостазиологии. М.: Принт; 2013.

REFERENCES

1. Sviridova S.P., Somonova O.V., Kashija Sh.R., Obuhova O.A., Sotnikov A.V. The role of platelets in inflammation and immunity. *Issledovaniya i praktika v meditsine*. 2018; 5(3): 40-52. (in Russian)
2. Bushueva N.A., Vorobyeva N.A. Physiology and pathophysiology of the haemostatic system in athletes (review). *Zhurnal mediko-biologicheskikh issledovaniy*. 2015; 2: 62-70. (in Russian)
3. Koloskov A.V. Von Willebrand disease. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*. 2017; 19(11): 43-8. (in Russian)
4. Rozina T.P., Fastovets S.V., Starostina E.E., Samokhodskaya L.M., Krasnova T.N. The clinical role of blood coagulation and platelet receptors gene allelic variants in development of Wilson's disease. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2018; 28(2): 50-5. (in Russian)
5. Kubyshekin A.V., Pylayeva N.Y., Fomochkina I.I., Pisarev A.A. Trauma, hemostasis and disseminated intravascular coagulation syndrome: pathogenic mechanisms of coagulation disorders. *Klinicheskaya patofiziologiya*. 2016; 22(4): 104-17. (in Russian)
6. Baranov A.A., Namazova-Baranova L.S., Borovik T.E., Bushueva T.V., Globa O.V., Zhurkova N.V. et al. Homocystinuria in children. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2017; 16(6): 457-67. (in Russian)
7. Stuleva N.S., Khizroeva D.Kh., Mashkova T.Y., Abramyan G.R. Circulation of antiphospholipid antibodies and IVF failures. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya*. 2015; 9(3): 6-10. (in Russian)
8. Magomedov M.M., Imanaliev M.R., Magomedov Kh.M.. Features of the system of hemostasis and systemic inflammatory response in patients with mechanical jaundice, complicated by liver failure. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*. 2018; 20(6): 59-63. (in Russian)
9. Gergesova E.E., Vitkovskij Ju.A., Solpov A.V. Platelet aggregation, lymphocyte-platelet adhesion and AB0 blood groups in patients with influenza A (H1N1). *Zabaykalskiy meditsinskiy vestnik*. 2011; 1: 4-9. (in Russian)
10. Koster T., Blann A.D., Briet E., Vandenbroucke J.P., Rosendaal F.R. Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep-vein thrombosis. *Lancet*. 1995; 345: 152-5.
11. Kosyakova Y.A., Davydkin I.L., Stepanova T.Y., Kurtov I.V., Kudina N.A. Evaluation of anemia syndrom in haemophilia. *Vestnik Rossijskogo universiteta Druzhby narodov. Seriya: Meditsina*. 2010; 4: 258-9. (in Russian)
12. Kosyakova Y.A. Blood biochemistry parameters in patients with hemophilia. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 94(5): 707-10. (in Russian)
13. Xu X., Xu F., Ying Y., Hong X., Liu Y., Chen S. et al. AB0 antigen levels on platelets of normal and variant AB0 blood group individuals. *Platelets*. 2018; 1-7. Doi: 10.1080/09537104.2018.1543863.
14. Timur A.A., Barnard J., Murugesan G., Gandhi S., Bhatt D.L., Kottke-Marchant K. The relation between AB0 blood types and clinical and platelet function parameters in patients who underwent percutaneous coronary intervention. *Coronary Artery Disease*. 2019; 30(1): 51-8.
15. Berkovskij A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., Kozlov A.A. External path of blood clotting. Methods of research. Methodological guidance. [Vneshniy put' svertyvaniya krovi. Metody issledovaniya. Metodicheskoe rukovodstvo]. Moscow: RENAM; 2017. (in Russian)
16. Dong R., Wang N., Yang Y., Ma L., Du Q., Zhang W. et al. Review on Vitamin K Deficiency and its Biomarkers: Focus on the Novel Application of PIVKA-II in Clinical Practice. *Clinical Laboratory*. 2018; 64(4): 413-24.
17. Smith N.L., Chen M.H., Dehghan A., Strachan D.P., Basu S., Soranzo N. et al. Novel associations of multiple genetic loci with plasma levels of factor VII, factor VIII, and von Willebrand factor: The CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genome Epidemiology) Consortium. *Circulation*. 2010; 121(12): 1382-92.
18. Canis K., McKinnon T.A., Nowak A., Panico M., Morris H.R., Laffan M. et al. The plasma von Willebrand factor O-glycome comprises a surprising variety of structures including ABH antigens and disialosyl motifs. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2010; 8(1): 137-45.
19. Wang Z., Dou M., Du X., Ma L., Sun P., Cao H. et al. Influences of AB0 blood group, age and gender on plasma coagulation factor VIII, fibrinogen, von Willebrand factor and ADAMTS13 levels in a Chinese population. *PeerJ*. 2017; 5: e3156.
20. Petrova O.V., Urtaeva Z.A., Shashin S.A., Tarasov D.G. Reference hemostasis intervals of values in the adult population of the Astrakhan region using automatic coagulometer «Sta Compact». *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii*. 2016; 2: 63-6. (in Russian)
21. Kozlov A.A., Berkovskij A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V. Preanalytical stage in hemostasiology. [Preanaliticheskiy etap v gemostaziologii]. Moscow: Print; 2013. (in Russian)

Поступила 20.12.18

Принята к печати 23.03.19

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Дьяконов Д.А., Росин В.А., Федоровская Н.С.

РАСХОЖДЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО АНАЛИЗА И МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ (ПРИМЕРЫ КЛИНИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ)

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», 610027, Киров, Россия

Представлены случаи расхождения результатов микроскопического исследования клеток крови врачами-морфологами с данными, полученными при использовании автоматического анализатора, у пациентов гематологического профиля. Показано, что в ряде случаев анализатор не определяет изменений морфологии эритроцитов, допускает погрешности в подсчете лейкоформулы, дифференцировке клеток по степени зрелости, оценке количества тромбоцитов. Подчеркнуто взаимодополняющее значение методов световой микроскопии и автоматизированного анализа крови у пациентов с подозрением на патологию системы крови.

Ключевые слова: анализ крови; микроскопическая оценка; гематологический анализатор.

Для цитирования: Дьяконов Д.А., Росин В.А., Федоровская Н.С. Расхождения результатов автоматизированного анализа и микроскопического исследования крови (примеры клинических случаев). Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (3): 176-179. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-176-179>

Diakonov D.A., Rosin V.A., Fedorovskaya N.S.

DISTINCTIONS OF THE RESULTS OF AUTOMATED ANALYSIS AND MICROSCOPIC BLOOD INVESTIGATION (EXAMPLES OF CLINICAL CASES)

Federal State Budgetary Institution of Science "Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of Federal Medical and Biologic Agency", 610027, Kirov

There are cases of discrepancies between the results of a microscopic examination of blood cells by morphological physicians with data obtained using an automatic analyzer in patients with a hematologic profile. It is shown that in some cases the analyzer does not determine changes in the morphology of erythrocytes, allows errors in calculating the leukoformula, differentiation of cells according to the degree of maturity, and evaluation of the number of platelets. The complementary importance of methods of light microscopy and automated blood analysis in patients with suspected pathology of the blood system is underlined.

Key words: a blood test; a microscopic evaluation; a hematological analyzer.

For citation: Diakonov D.A., Rosin V.A., Fedorovskaya N.S. Distinctions of the results of automated analysis and microscopic blood investigation (examples of clinical cases). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2019; 64 (3): 176-179 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-176-179>

For correspondence: Diakonov D.A., Dr. Sci. Med., head of the library of pathomorphology; e-mail: diakonovda@rambler.ru

Information about authors:

Diakonov D.A., <http://orcid.org/0000-0001-8688-1344>

Rosin V.A., <http://orcid.org/0000-0003-2054-2870>

Fedorovskaya N.S., <http://orcid.org/0000-0002-2160-0035>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 06.11.2018
Accepted 06.12.2018

Введение. Общий анализ крови (ОАК) является лабораторным исследованием, которое включает в себя оценку, подсчет всех видов клеток крови (эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов) с выявлением их морфологических и количественных особенностей (лейкоформула), измерение уровня гемоглобина и определение соотношения

клеточной массы к плазме (гематокрит). Метод считается доступным, базовым, его результаты дают общее представление о состоянии здоровья пациента и позволяют определяться в дальнейшей диагностической тактике. Контроль показателей гемограммы в динамике применяется для анализа эффективности проводимого лечения [1 - 3]. Процедура лабораторного исследования крови подразделяется на три основных этапа: преаналитический, аналитический, постаналитический. Строгое соблюдение стандартов и рекомендаций по обеспечению

Для корреспонденции: Дьяконов Дмитрий Андреевич, канд. мед. наук, зав.лаб. патоморфологии; e-mail: DiakonovDA@rambler.ru

нию качества данных этапов служит основным условием диагностики.

В настоящее время для оценки гемограммы используются методы автоматизированного анализа и световой микроскопии мазков периферической крови. Оба этих способа имеют свои преимущества и во многом являются взаимодополняющими. В лабораторной практике широко применяются гематологические анализаторы, которые обладают существенными аналитическими возможностями, включают в анализ большое количество клеток (десятки тысяч), а также способны одновременно определять более 30 параметров крови. Такое оборудование имеет высокую производительность и воспроизводимость результатов, возможность графического представления данных [4–6].

Ошибки и неточности автоматизированного анализа, как правило, объясняются двумя основными причинами: технической погрешностью (нарушение стандартов преаналитического этапа) и особенностями патологических изменений клеток крови. Согласно нормативным документам, при работе с гематологическими анализаторами все случаи отклонения параметров крови от установленных границ требуют дополнительного визуального контроля окрашенных препаратов под микроскопом [5]. Это обусловлено тем, что даже самые современные гематологические анализаторы обладают некоторыми ограничениями в точной оценке морфологии клеток и не в состоянии полностью заменять световую микроскопию. Без помощи микроскопического анализа мазков невозможно определить особенности структуры хроматина ядродержащих элементов, что достаточно значимо для дифференцировки степени их зрелости и оценки атипичности клеток. Наилучшим способом выявления скоплений и аномалий строения тромбоцитов при нарушениях со стороны мегакариоцитарного ростка кроветворения, анализа изменений формы эритроцитов при различных видах анемий, определения внутриклеточных включений по-прежнему считается микроскопия мазка крови врачом-морфологом.

Материал и методы. В лаборатории патоморфологии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России» за период с 2015 по 2017 гг. при пересмотре консультативного материала мазков периферической крови у пациентов с подозрением на патологию системы крови (серия наблюдений) выявлен ряд расхождений между данными гематологического анализатора (анализатор гематологический ХТ-4000i производства «Sysmex Corporation», Япония) и исследованием мазков врачами в световом микроскопе. Ниже представлены примеры клинических случаев, иллюстрирующие результаты.

Результаты. Клинический случай №1. Пациент, 10 лет. В течение 7 лет наблюдался в ФГБУН КНИИ-ГиПК ФМБА России с предварительным диагнозом «Иммунная тромбоцитопения». На момент очередной (контрольной) явки к гематологу (27.06.2017г.) жалоб не предъявлял, признаков геморрагического синдрома не выявлено. Назначено плановое исследование ОАК. По результатам гематологического анализатора: гемоглобин 151 г/л; эритроциты $5,25 \times 10^{12}/л$; тромбоциты $294 \times 10^9/л$; лейкоциты $6,3 \times 10^9/л$, из них лимфоцитов 32%, базофилов 0,5% и 67,5% представлено моноцитами. Выраженный абсолютный моноцитоз ($4,3 \times 10^9/л$) в периферической крови предварительно расце-

нивался как реактивный процесс (инфекции), а также как один из критериев ювенильного миеломоноцитарного лейкоза.

При пересмотре мазков периферической крови под микроскопом в формуле ОАК выявлено: сегментоядерные нейтрофилы 52%, эозинофилы 2%, лимфоциты 18%, моноциты 28% ($1,7 \times 10^9/л$). Полученные результаты критериально трактовались как остаточные морфологические признаки инфекционного процесса. Ребенок отправлен домой с рекомендацией повторного исследования ОАК в динамике (через 2-3 недели). На сегодняшний день ребенок жалоб не предъявляет (здоров), показаний для назначения специализированной гематологической помощи нет.

Клинический случай №2. Больная, 71 г. Обратилась за медицинской помощью и была госпитализирована в терапевтическое отделение КОГБУЗ «Кировская областная клиническая больница» 27.09.2017 г. В ОАК, выполненному в лаборатории ЛПУ по месту жительства: гемоглобин 38 г/л; эритроциты $1,4 \times 10^{12}/л$; MCV 93,7 фл; MCHC 28,6 г/дл; тромбоциты $23 \times 10^9/л$; лейкоциты $12,4 \times 10^9/л$, из них лимфоцитов 94%. Субъективно: в течение 1,5 мес. жалобы на слабость, головокружение. Объективно: за последние две недели появились геморрагии на теле, присоединилась одышка. По данным ультразвукового исследования, спленомегалия. Предварительно поставлен диагноз: «Хронический лимфолейкоз?». Назначен повторный ОАК с пересмотром мазков периферической крови под микроскопом: гемоглобин 55 г/л; эритроциты $1,97 \times 10^{12}/л$; MCV 84,8 фл; MCHC 32,8 г/дл; тромбоциты $10 \times 10^9/л$; лейкоциты $9,75 \times 10^9/л$, из них лимфоцитов 89%. При анализе мазков крови врачами-морфологами ЛПУ по месту жительства обнаружено 4% бластных клеток, 5% пролимфоцитов, 87% лимфоцитов.

Вследствие нарастания слабости, ухудшения общего состояния мазки крови пациентки направлены на пересмотр в лабораторию патоморфологии ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. В результате проведенной оценки в большом количестве выявлены бластные элементы (89%), преимущественно мелких размеров (предположительно лимфобласты по типу «L1»), с округлой и неправильной формами ядер, бугристой и мелкозернистой структурой хроматина, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, в части бластов встречались ядрышки (рис. 1, см.обложку). Предварительный диагноз изменен. С подозрением на острый лейкоз 02.10.2017 г. больная переведена во взрослое гематологическое отделение клинического института. При дальнейшем исследовании в костном мозге определена выраженная инфильтрация лимфобластами (90,2%). Данные цитохимии и проточной цитометрии подтвердили лимфоидную природу опухоли с V-линейной направленностью: TdT (33%); CD19 (99%); CD10 (92%); CD24 (97%). На сегодняшний день проведено 2 цикла индукционной химиотерапии и 2 курса консолидации; состояние пациентки удовлетворительное. В ОАК сохраняется анемия (гемоглобин 90 г/л) и лейкопения (лейкоциты $1,45 \times 10^9/л$), количество тромбоцитов в пределах нормы ($262 \times 10^9/л$).

Клинический случай №3. Пациент, 26 лет. С жалобами на лихорадку и слабость обратился к врачу по месту жительства 18.09.2017 г. Объективно: увеличение шейных, подчелюстных и подмышечных лимфоузлов до 2-3 см. По данным ультразвукового исследования, умеренная

спленомегалия (134 x 56 мм). В ОАК обнаружены следующие изменения: незначительная тромбоцитопения ($137 \times 10^9/\text{л}$) и лейкоцитоз ($31,8 \times 10^9/\text{л}$). При подсчете лейкоформулы с помощью гематологического анализатора: палочкоядерных нейтрофилов 3%, сегментоядерных нейтрофилов 46%, эозинофилов 4%, лимфоцитов 40%, моноцитов 7%. Пересмотр мазков периферической крови врачами-лаборантами ЛПУ по месту жительства не проводился. С предварительным диагнозом “Инфекционный мононуклеоз? Лейкемоидная реакция? Лимфома?” направлен на консультацию к гематологу в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

В результате оценки мазков крови (от 21.09.2017 г.) под микроскопом врачами-морфологами обнаружены бластные клетки (65%), преимущественно средних размеров, с округлой и неправильной формами ядер, нежно-сетчатой структурой хроматина, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, четкими ядрышками в большинстве бластов, узкой светло-базофильной беззернистой цитоплазмой (рис. 2, см.обложку). Предварительный диагноз изменен на “Острый лейкоз”. При анализе костного мозга установлена выраженная инфильтрация лимфобластами (85,2%). Данные проточной цитометрии подтвердили лимфоидную природу опухоли с Т-линейной направленностью: CD2 (99%), CD3 (87%), CD5 (99%), CD7 (99%), TdT (15%). Проведено 2 цикла индукции и 2 курса консолидации по смехе “ОЛЛ-2016”; состояние пациента на 15.01.2018 г. хорошее. В ОАК отмечается незначительная анемия (гемоглобин 105 г/л); количество лейкоцитов в пределах нормы ($5,6 \times 10^9/\text{л}$); содержание тромбоцитов $332 \times 10^9/\text{л}$. Костный мозг полиморфный, признаков инфильтрации опухолевыми клетками нет.

Клинический случай №4. Больной, 7 лет. В течение недели отмечались гриппоподобные симптомы, в домашних условиях принимал амоксициллин. При поступлении в лечебное учреждение по месту жительства выявлена шейная лимфаденопатия (2-3 см). В анамнезе выполнена спленэктомия по поводу наследственного сфероцитоза. В ОАК установлено значительное увеличение количества лейкоцитов ($100 \times 10^9/\text{л}$) с выраженным преобладанием абсолютного числа лимфоцитов ($85 \times 10^9/\text{л}$). Результаты подсчета лейкоформулы в гематологическом анализаторе сопоставимы с данными, полученными врачами-лаборантами ЛПУ по месту жительства при микроскопии мазков периферической крови. С предварительным диагнозом “Лимфома?” направлен в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России на консультацию к гематологу.

При оценке гемограммы врачами лаборатории патоморфологии на фоне повышенного содержания лимфоцитов выявлены атипичные мононуклеары, относительное число которых оставило 10% (рис.3, см. обложку). Кроме того, в отдельных эритроцитах встречались включения в виде телец Хауэлла-Жолли, что расценено как особенность состояния отдельных эритроцитов после удаления селезенки. Данные морфологические особенности гематологическим анализатором не отмечены. Результаты полимеразной цепной реакции подтвердили наличие в крови вируса Эпштейна-Барра. Поставлен окончательный диагноз – “Инфекционный мононуклеоз”, назначена соответствующая терапия, в результате которой в течение недели содержание лейкоцитов снизилось до $13,9 \times 10^9/\text{л}$ (абсолютное содержание лимфоцитов $8,8 \times 10^9/\text{л}$). На сегодняшний день ребенок жалоб не предъявляет, по-

казаний для назначения специализированной гематологической помощи нет.

Клинический случай №5. Пациентка, 40 лет. Обратилась в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России с жалобами на слабость, обильные месячные (7-10 дней) в течение 10 лет. По результатам ОАК, выполненного с помощью гематологического анализатора, обнаружена выраженная тромбоцитопения ($16 \times 10^9/\text{л}$); остальные показатели гемограммы находились в пределах нормальных значений: гемоглобин 125 г/л, эритроциты $4,6 \times 10^{12}/\text{л}$, MCV 84 фл, лейкоциты $7,2 \times 10^9/\text{л}$. Поставлен предварительный диагноз “Иммунная тромбоцитопения”. Вследствие крайне низкого содержания тромбоцитов решался вопрос о необходимости переливания тромбоцитного концентрата.

При оценке мазков периферической крови под микроскопом в значительном количестве выявлены скопления тромбоцитов в виде агрегатов средних и крупных размеров, обнаружены макроформы тромбоцитов (рис. 4, см.обложку). Относительное содержание тромбоцитов при подсчете составило $100-150 \times 10^9/\text{л}$. Показаний для проведения гемотрансфузии не обнаружено. Рекомендовано динамическое наблюдение у врача-гематолога с целью исключения тромбоцитопатии.

Обсуждение. Ошибочные результаты автоматизированного анализа крови встречаются в отношении всех основных показателей (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты), отражающих состояние кроветворения. В ряде случаев анализатор не определяет изменений формы эритроцитов и наличия в них включений. Это может привести к ошибочной интерпретации результатов и дальнейшей неверной тактике ведения больных, в частности, пациентов с анемиями. Нередки ошибки при дифференцировке степени зрелости и оценке атипичности лейкоцитарных элементов. Это имеет важное значение при выявлении онкогематологической патологии (острые лейкозы, лимфомы, хронические миелопролиферативные неоплазии), инфекционных заболеваний и проведении дифференциальной диагностики между этими нозологиями. Определение количества тромбоцитов с помощью автоматического гематологического анализатора является стандартизованным методом оценки их содержания. Тем не менее в ряде случаев аппарат допускает определенные погрешности в их подсчете. Чаще всего это встречается при наличии в периферической крови агрегационных скоплений или макроформ тромбоцитов.

Заключение. Таким образом, микроскопическое исследование крови не утратило своего диагностического значения, а в ряде ситуаций оно является определяющим. Все случаи отклонения параметров автоматизированного анализа от референсных значений требуют обязательного пересмотра окрашенных препаратов крови под микроскопом опытными врачами-морфологами. При наличии клинических симптомов заболевания системы крови микроскопическое исследование рекомендуется проводить в специализированной лаборатории. Это обеспечит объективность, точность и высокое качество его результатов, снизит вероятность диагностических ошибок.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Митрохин С.Д., Калачева О.С., Орлова О.Е., Шкода А.С., Ключкина Т.В. Централизация лабораторных исследований: модная тенденция или реальная необходимость? *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (7): 444-8.
2. Петрух А., Сидорко И., Гаврилишин Г. Внешний контроль качества гематологических исследований. Опыт межлабораторных сравнительных результатов. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2016; 1: 26-33.
3. Федоровская Н.А., Федоровская Н.С., Дьяконов Д.А. Значение показателей периферической крови в оценке результатов脾切除术 у больных апластической анемией. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2011; 2, (34): 41-3.
4. Петрова О.В., Шашин С.А., Тарасов Д.Г., Жукова Е.Р., Панова Е.В., Грачева Н.П. Референтные значения агрегации тромбоцитов у взрослого населения Астраханской области на агрегометре MULTIPATE. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (1): 46-8.
5. Погорелов В.М., Иванова Л.А., Козинет Г.И. Эффективность и информативность гематологических анализаторов. *Гематология и трансфузиология*. 2012; 57 (3): 30-7.
6. Сергиенко Л.И. Особенности лабораторных методов подсчета тромбоцитов. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2015; 2: 119-25.

REFERENCES

1. Mitrokhin S.D., Kalacheva O.S., Orlova O.E., Shkoda A.S., Klyukina T.V. Centralization of laboratory research: a fashion trend or a real need? *Clinical laboratory diagnostics*. 2017; 62, (7): 444-8. (in Russian)
2. Petrukh A., Sidorko I., Gavrilishin G. External quality control of hematological studies. Experience of interlaboratory comparative results. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*. 2016; 1: 26-33.
3. Fedorovskaya N.A., Fedorovskaya N.S., Diakonov D.A. The value of peripheral blood indices in assessing the results of splenectomy in patients with aplastic anemia. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2011; 2 (34): 41-3. (in Russian)
4. Petrova O.V., Shashin S.A., Tarasov D.G., Zhukova E.R., Panova E.V., Gracheva N.P. Reference values of platelet aggregation in the adult population of the Astrakhan region on the MULTIPATE aggregometer. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61 (1): 46-8. (in Russian)
5. Pogorelov V.M., Ivanova L.A., Kozinets G.I. Efficiency and informativeness of hematological analyzers. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2012; 57, (3): 30-7.
6. Sergienko L.I. Features of laboratory methods for calculating platelets. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*. 2015; 2: 119-25.

Поступила 06.11.18

Принята к печати 06.12.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Прохватилова Е.В., Тетерятникова Н.Н., Захарова И.Б., Белицкая Л.И., Викторов Д.В., Топорков А.В.

ПРОВЕДЕНИЕ ЭТАПОВ ГОСУДАРСТВЕННОЙ РЕГИСТРАЦИИ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ДНК БУРКХОЛЬДЕРИЙ ГРУППЫ «PSEUDOMALLEI»

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
400131, Волгоград, Россия

Для клинической лабораторной диагностики разработано медицинское изделие (МИ), предназначенное для обнаружения и одновременной дифференциации ДНК трех видов буркхольдерий группы «pseudomallei» - возбудителя мелиоидоза (B. pseudomallei), возбудителя сапа (B. mallei) и B. thailandensis по набору генов β-лактамаз молекулярных классов B и D с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретическим способом детекции. Оценены функциональные свойства МИ, проведены испытания, завершены этапы экспертизы и регистрации в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения. При проведении клинических испытаний подтверждена эффективность применения набора реагентов при исследовании различных проб клинического материала и выделенных культур микроорганизмов. Установлено, что показатель диагностической чувствительности набора реагентов для выявления и дифференциации возбудителей сапа, мелиоидоза и B. thailandensis составляет не менее 99 %, диагностической специфичности – не менее 99 %, при доверительной вероятности 90 % при анализе каждого из показателей.

Ключевые слова: мелиоидоз; сап; B. thailandensis; полимеразная цепная реакция с электрофоретическим способом детекции; набор реагентов.

Для цитирования: Прохватилова Е.В., Тетерятникова Н.Н., Захарова И.Б., Белицкая Л.И., Викторов Д.В., Топорков А.В. «Проведение этапов государственной регистрации набора реагентов для обнаружения и дифференциации ДНК буркхольдерий группы «pseudomallei». Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (3): 180-185.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-180-185>

Prokhvatilova E.V., Teteryatnikova N.N., Zakharova I.B., Belitskaya L.I., Viktorov D.V., Toporkov A.V.

PREPARATION FOR STATE REGISTRATION OF THE REAGENT KIT FOR THE DETECTION AND DIFFERENTIATION OF THE DNA OF BURKHOLDERIA «PSEUDOMALLEI» GROUP

Federal Government Health Institution "Volgograd Research Institute for Plague Control of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights' Protection and Human Well-being, 400131, Volgograd, Russia

The reagent kit designed to detect and simultaneously differentiate the DNA of three species of Burkholderia pseudomallei – causative agents of melioidosis (B. pseudomallei), glanders (B. mallei) and B. thailandensis by the set of genes of β-lactamases with B and D molecular classes using a multiplex polymerase chain reaction with electrophoretic detection was developed for clinical laboratory diagnosis. The functional properties of the reagent kit were evaluated, tests were carried out, the stages of examination and registration in the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights' Protection and Human Well-being were completed. During clinical testing the effectiveness of the reagent kits in the study of various samples of clinical material and isolated cultures of microorganisms was confirmed. It has been established that the indicator of diagnostic sensitivity of the reagent kit for the detection and differentiation of the glanders, melioidosis and B. thailandensis causative agents was less than 99 %, diagnostic specificity – not less than 99 % with a confidence probability of 90 % in the analysis of each of the indicators.

Key words: melioidosis; glanders; B. thailandensis; polymerase chain reaction with electrophoretic detection; reagent kit.

For citation: Prokhvatilova E.V., Teteryatnikova N.N., Zakharova I.B., Belitskaya L.I., Viktorov D.V., Toporkov A.V. Preparation for state registration of the reagent kit for the detection and differentiation of the DNA of burkholderia «pseudomallei» group. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (3): (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-180-185>

For correspondence: Prokhvatilova E.V., candidate of medical sciences, associate professor, head of the Department of biological and technological control; e-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Information about authors:

Prokhvatilova E.V., <http://orcid.org/0000-0001-9947-7711>

Teteryatnikova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-8928-2152>

Zakharova I.B., <https://orcid.org/0000-0002-7808-7658>

Belitskaya L.I., <http://orcid.org/0000-0002-1803-9443>

Viktorov D.V., <http://orcid.org/0000-0002-2722-7948>

Toporkov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-3449-4657>

Acknowledgments. This study had no sponsorship.

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

Received 10.01.2019
Accepted 04.02.2019

Введение. Высокопатогенные для человека и различных видов животных буркхольдерии *B. pseudomallei*, *B. mallei*, а также *B. thailandensis* выделены в отдельную группу «*pseudomallei*» и обладают фенотипическим и генетическим сходством, что значительно затрудняет проведение лабораторных исследований по видовой идентификации и дифференциации данных видов микроорганизмов.

Оба вида, *B. pseudomallei*, *B. mallei* – относятся к микроорганизмам II группы патогенности, являются возбудителями особо опасных инфекционных болезней мелиоидоза и сапа, соответственно, и включены в перечень потенциальных биологических агентов биотерроризма (ПБА) [2]. *Burkholderia thailandensis* – микроорганизм III группы патогенности, однако способен вызывать инфекции различной степени тяжести с разнообразными клиническими проявлениями, схожими с мелиоидозом, что в значительной мере затрудняет его дифференциальную диагностику с *B. pseudomallei*.

Разнообразный характер течения инфекционных заболеваний, вызванных *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*, не имеющих специфических симптомов и синдромов и протекающих, как правило, с образованием абсцессов в органах и тканях и явлениями сепсиса, чаще всего исключает возможность установить своевременный и точный диагноз на основе клинических данных. Ввиду фенотипического и генетического сходства *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* иммунологические методы (МФА, РНГА, ТИФМ), основанные на определении антигенов или антител, как правило, не решают проблемы дифференциальной диагностики данных инфекций. В современных условиях наибольшее значение и перспективность для этого имеют геннодиагностические системы (наборы), предназначенные для обнаружения ДНК микроорганизмов, и адаптированные для ПЦР с высокочувствительным способом регистрации результатов и мультипараметрической детекции [1].

Специалистами ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Референс центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза) завершены исследования по разработке «Набора реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы «*pseudomallei*» в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D – EPh» по ТУ 21.20.23-014-01898084-2016», предназначенного для обнаружения ДНК и одновременной дифференциации 3-х видов буркхольдерий группы «*pseudomallei*» – возбудителя мелиоидоза (*B. pseudomallei*), возбудителя сапа (*B. mallei*) и *B. thailandensis* по набору генов β-лактамаз молекулярных классов V и D в пробах выделенных культур микроорганизмов, клинического и секционного материала методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретическим способом детекции (далее – мультиплексной ПЦР) [3–5].

Данное МИ позволяет с помощью ПЦР обнаруживать специфические фрагменты ДНК у *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*. Одна пара группоспецифических праймеров обеспечивает амплификацию фрагмента гена β-лактамазы класса V у *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*. Вторая пара группоспецифических праймеров обеспечивает амплификацию фрагмента гена

β-лактамазы класса V у *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Третья пара группоспецифических праймеров обеспечивает амплификацию фрагмента гена β-лактамазы класса D у *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*. Детекцию продуктов амплификации осуществляют с помощью электрофореза в агарозном геле [3 - 5].

Целью настоящего исследования явились испытание и оценка возможности применения в медицинской лабораторной практике набора реагентов, предназначенного для обнаружения ДНК и одновременной дифференциации 3-х видов буркхольдерий группы «*pseudomallei*» – возбудителя мелиоидоза (*B. pseudomallei*), возбудителя сапа (*B. mallei*) и *B. thailandensis* по набору генов β-лактамаз молекулярных классов V и D в пробах выделенных культур микроорганизмов, клинического материала (кровь, моча, мокрота, спинномозговая жидкость, отделяемое язв, пунктаты из лимфатических узлов, экссудаты, абсцессы, рвотные массы, испражнения), секционного материала (биоптаты печени, селезенки, легкого, сердца, почки, головной мозг) методом мультиплексной ПЦР.

Материал и методы. В состав медицинского изделия «Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы «*pseudomallei*» в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D – EPh» по ТУ 21.20.23-014-01898084-2016» (далее – «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D – EPh») входят следующие компоненты:

- ПЦР - смесь № 1 – 1 пробирка по 0,5 мл;
- ПЦР - смесь № 2 – 1 пробирка по 0,1 мл;
- Taq-ДНК-полимераза - 1 пробирка по 0,02 мл;
- ПКО (положительный контрольный образец) – 1 пробирка по 0,4 мл;
- ОКО (отрицательный контрольный образец) – 1 пробирка по 0,4 мл;
- вода деионизованная – 1 пробирка по 0,4 мл;
- минеральное масло - 2 пробирки по 1,0 мл.

В зависимости от степени потенциального риска применения в медицинских целях набор реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D – EPh» относится к классу 3.

Поскольку аналогов набору реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D – EPh», зарегистрированных на территории Российской Федерации не существует, испытания проводились без использования препарата для сравнения.

Штаммы микроорганизмов. При проведении клинических испытаний набора реагентов использовали 15 штаммов *B. pseudomallei*, 13 штаммов *B. mallei*, 5 штаммов *B. thailandensis* и 24 штаммов гетерологичных микроорганизмов, их них 2 штамма *Burkholderia cepacia*, 5 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, 2 штамма *Klebsiella pneumoniae*, 3 штамма *Escherichia coli*, 1 штамм *Proteus mirabilis*, 2 штамма *Staphylococcus aureus*, 1 штамм *Staphylococcus epidermidis*, 6 штаммов *Vibrio cholera*.

Для определения показателя чувствительности методом ПЦР с применением испытуемого МИ были использованы бактериальные суспензии *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* в концентрации 1×10^4 м.к./мл и бактериальные суспензии гетерологичных микроорганизмов в концентрации 1×10^7 м.к./мл.

Для оценки диагностической чувствительности МИ при исследовании проб клинического и секционного материала были подготовлены:

– пробы клинического материала (кровь человека, мокрота, моча, спинномозговой жидкости, содержимое язв, абсцессов и экссудаты, испражнений человека), искусственно контаминированные *B. pseudomallei* С-141, *B. mallei* P-1, *B. thailandensis* 2.1 до конечной концентрации 1×10^4 м.к./мл и *P. aeruginosa* 4000 до конечной концентрации 1×10^7 м.к./мл.

– пробы секционного материала (печень, селезенка, легкое), искусственно контаминированные *B. pseudomallei* С-141, *B. mallei* P-1, *B. thailandensis* 2.1 до конечной концентрации 1×10^4 м.к./мл и *P. aeruginosa* 4000 до конечной концентрации 1×10^7 м.к./мл.

Объем каждого образца исследуемой пробы – 0,05 мл. Все пробы до постановки опыта хранились при температуре минус 18 °С, во время опыта при плюс 4 °С, но не более 3 суток. Все пробы были одновременно исследованы методом ПЦР с применением набора реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D – EPh» и микробиологическим методом (высевом на соответствующие плотные питательные среды из каждого разведения).

Подготовка проб чистых культур микроорганизмов для мультиплексной ПЦР. Культивирование *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и гетерологичных микроорганизмов осуществляли на агаре Луриа («HiMedia», Индия, ФСЗ 2009/03707), рН (7,0±0,2), инкубировали в течение 24–48 часов при температуре (37±1) °С. Из выросших культур готовили суспензии в 2 мл 0,9 %-ого раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует 1×10^9 м.к./мл для *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* и 5 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-59-86П (5МЕ)), что соответствует $1,1 \times 10^9$ м.к./мл для *V. cholerae*. Затем проводили десятикратные разведения подготовленных суспензий клеток в 0,9 % стерильном растворе натрия хлорида до конечной концентрации 1×10^3 м.к./мл. Для исследования использовали бактериальные суспензии *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* в диапазоне от 1×10^3 до 1×10^5 м.к./мл и гетерологичных микроорганизмов плотностью 1×10^7 м.к./мл.

Количество клеток в приготовленных разведениях проверяли путем посева из концентрации 1×10^3 м.к./мл по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма на чашки Петри с агаром Луриа. Через 24–48 ч инкубации в термостате при температуре (37±1) °С подсчитывали количество колоний, выросших на поверхности агара.

Проведение ПЦР. Выделение ДНК осуществляли методом аффинной сорбции на частицах силикагеля с использованием коммерческого набора «Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» (ФСР 2008/03993, ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией к указанному набору.

Постановку реакций проводили с использованием амплификатора типа С1000 (Термоциклер С1000, «Bio-Rad», США) с наборами реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D – EPh». Детекцию результатов ПЦР осуществляли методом электрофореза при напряженности электрического поля 5 В/см в течение 40 мин в 1,5 % агарозном геле, используя коммерческий набор «Комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном

геле «ЭФ», вариант генотип-300» (ФСР 2008/03146, ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Учет и интерпретацию результатов ПЦР-анализа проводили по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических фрагментов ДНК в сравнение с «положительным контролем».

Для определения межпостановочной и межсерийной воспроизводимости одинаковые положительные пробы исследовали повторно с использованием двух серий набора реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D – EPh» (серия 6/18, дата изготовления 20.02.2018, годен до 08.2018 г.; серия 7/18, дата изготовления 20.02.2018, годен до 08.2018 г.). Для определения внутривыставочной воспроизводимости одинаковые положительные пробы исследовали в пяти повторах с использованием двух серий набора «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D – EPh».

В качестве метода сравнения использовали микробиологический метод исследования микроорганизмов рода *Burkholderia* в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)», МУ 4.2.2787-10 «Лабораторная диагностика мелиоидоза», МУ 4.2.2831-11 «Лабораторная диагностика сапа» с последующей идентификацией буркхольдерий группы «*pseudomallei*» на основании роста на дифференциально-диагностических средах (агар Эшдауна, триптиказо-соевый агар с 4 % глицерина, минимальный агар с L-арабинозой).

При проведении мультиплексной ПЦР с «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D – EPh» и микробиологического метода исследуемые образцы рассматривали как инфекционно-опасные, поэтому этапы подготовки проб проводили в соответствии с требованиями СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности», МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Статистическую обработку результатов клинических испытаний проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий», утвержденными 14.11.2013 г. ФГБУ «ЦМИ-КЭЭ» Росздравнадзора и ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора, ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов». Статистическую достоверность полученных результатов испытаний оценивали в зависимости от числа параллельных опытов при доверительной вероятности 90 %, используя формулу биномиального распределения Бернулли.

Результаты и обсуждение. Необходимость разработки МИ «Амплиген Буркхольдерии группы «*pseudomallei*» βL V/D – EPh», основанного на технологии мультиплексной ПЦР, была обусловлена отсутствием геннодиагностических наборов реагентов для обнаружения и одновременной дифференциации 3-х видов буркхольдерий группы «*pseudomallei*» – возбудителя мелиоидоза (*B. pseudomallei*), возбудителя сапа (*B. mallei*) и *B. thailandensis* в различных объектах исследования.

Результаты исследований чувствительности МИ «Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы *«pseudomallei»* в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D – EPh» по ТУ 21.20.23-014-01898084-2016» с помощью ПЦР с электрофоретическим способом детекции

| Наименование проб | Число проб | Положительный ответ в ПЦР «Амплиген Буркхольдерии группы <i>«pseudomallei»</i> βL B/D – EPh» | | Результат микробиологического метода |
|--|------------|--|------------|--------------------------------------|
| | | Серия 6/18 | Серия 7/18 | |
| Пробы чистых культур, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 35 | 35 | 35 | 35 |
| Пробы чистых культур, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 31 | 31 | 31 | 31 |
| Пробы чистых культур, содержащие <i>B. thailandensis</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 15 | 15 | 15 | 15 |
| Пробы клинического материала, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Пробы клинического материала, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Пробы клинического материала, содержащие <i>B. thailandensis</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Пробы секционного материала, содержащие <i>B. pseudomallei</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 11 | 11 | 11 | 11 |
| Пробы секционного материала, содержащие <i>B. mallei</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 11 | 11 | 11 | 11 |
| Пробы секционного материала, содержащие <i>B. thailandensis</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 11 | 11 | 11 | 11 |
| Итого положительных проб, содержащих <i>B. pseudomallei</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 64 | 64 | 64 | 64 |
| Итого положительных проб, содержащих <i>B. mallei</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Итого положительных проб, содержащих <i>B. thailandensis</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 44 | 44 | 44 | 44 |
| Итого положительных проб, содержащих буркхольдерии группы <i>«pseudomallei»</i> в концентрации 1×10^4 м.к./мл | 168 | 168 | 168 | 168 |

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – образцы анализировали в 2 повторах.

Аналитические характеристики набора реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D – EPh» были определены по результатам предварительных (контрольных испытаний) испытаний. Согласно конструкторской документации аналитическая чувствительность при идентификации и дифференциации ДНК *B. pseudomallei* составила не менее 1×10^4 м.к./мл, ДНК *B. mallei* – не менее 1×10^4 м.к./мл и ДНК *B. thailandensis* – не менее 1×10^4 м.к./мл. При определении показателя аналитической специфичности установлено, что набор реагентов не выявляет ДНК гетерологичных микроорганизмов в концентрации 1×10^7 м.к./мл.

В 2016 г. при проведении технических испытаний набора были подтверждены заявленные разработчиками функциональные характеристики и диагностическая эффективность МИ, а также согласованы вид, класс потенциального риска применения в соответствии с номенклатурной классификацией МИ. В результате испытаний проведена оценка и анализ данных, относящихся к функциональным свойствам МИ, доработка технической и эксплуатационной документации и оформлен акт испытаний. Полученные результаты были оценены экспертами как положительные и подтвердили эффек-

тивность и безопасность применения диагностического набора реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D – EPh».

В 2017 г. «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D – EPh» был представлен к государственной регистрации в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения в качестве медицинского изделия. В соответствии с Правилами государственной регистрации медицинских изделий, утвержденных постановлением Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 г. № 1416, регистрация МИ осуществлялась на основании результатов технических и клинических испытаний, а также результатов экспертизы документов регистрационного досье.

Экспертами подтверждено, что набор реагентов «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D – EPh» может быть использован для идентификации и одновременной дифференциации *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* с помощью мультиплексной ПЦР с электрофоретическим способом детекции. Результаты клинических испытаний МИ «Амплиген Буркхольдерии группы *«pseudomallei»* βL B/D – EPh» представлены в табл. 1, 2.

Результаты исследований специфичности МИ «Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы *«pseudomallei»* в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «Амплиген Буркхольдерий группы *«pseudomallei»* βL V/D – EPh» по ТУ 21.20.23-014-01898084-2016» с помощью ПЦР с электрофоретическим способом детекции

| Наименование проб | Число проб | Отрицательный ответ в ПЦР «Амплиген Буркхольдерий группы <i>«pseudomallei»</i> βL V/D - EPh» | | Результат микробиологического метода |
|---|------------|--|------------|--------------------------------------|
| | | Серия 6/18 | Серия 7/18 | |
| Пробы чистых культур, содержащие близкородственные и гетерологичные микроорганизмы в концентрации 1×10^7 м.к./мл | 49 | 49 | 49 | 49 |
| Пробы клинического материала, содержащие гетерологичные микроорганизмы в концентрации 1×10^7 м.к./мл | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Пробы секционного материала, содержащие гетерологичные микроорганизмы в концентрации 1×10^7 м.к./мл | 11 | 11 | 11 | 11 |
| Итого отрицательных проб, содержащих близкородственные и гетерологичные микроорганизмы в концентрации 1×10^7 м.к./мл | 78 | 78 | 78 | 78 |

При клинических испытаниях МИ «Амплиген Буркхольдерий группы *«pseudomallei»* βL V/D – EPh» на 336 положительных пробах (162 пробы суспензий микроорганизмов, 108 проб клинического материала и 66 проб секционного материала, искусственно контаминированных бактериальными агентами), содержащих буркхольдерий группы *«pseudomallei»* (*B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*) в концентрации 1×10^4 м.к./мл был получен положительный результат в 100 % случаев, на 156 отрицательных пробах (98 проб суспензий микроорганизмов, 36 проб клинического материала и 22 пробы секционного материала, искусственно контаминированных бактериальными агентами), содержащих близкородственные и гетерологичные микроорганизмы в концентрации 1×10^7 м.к./мл – отрицательный результат в 100 % случаев.

Таким образом, доказана диагностическая эффективность МИ «Амплиген Буркхольдерий группы *«pseudomallei»* βL V/D – EPh» по ТУ 21.20.23-014-01898084-2016:

– диагностическая чувствительность – не менее 99 % с доверительной вероятностью 90 %, при анализе 336 положительных проб, содержащих буркхольдерий группы *«pseudomallei»* (*B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*) в концентрации 1×10^4 м.к./мл получен положительный результат в 336 случаях,

– диагностическая специфичность – не менее 99 % с доверительной вероятностью 90 %; при исследовании 156 отрицательных проб, содержащих близкородственные и гетерологичные микроорганизмы (*B. seraciac*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *V. cholerae*) в концентрации 1×10^7 м.к./мл получен отрицательный ответ в 156 случаях.

Корректное определение видовой принадлежности буркхольдерий группы *«pseudomallei»* (*B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*) и специфичность набора реагентов подтверждалось параллельным использованием референсного классического микробиологического метода исследования.

В 2018 г. после завершения всех этапов экспертизы документов МИ «Амплиген Буркхольдерий группы *«pseudomallei»* βL V/D – EPh» Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения принято положительное решение о государственной регистрации МИ,

оформлено регистрационное удостоверение и разрешены производство, реализация и применение МИ в медицинской лабораторной практике.

Заключение. Одним из направлений совершенствования генной диагностики инфекционных болезней, в том числе ООИ, является разработка и внедрение в медицинскую лабораторную практику наборов реагентов для мультиплексной технологии ПЦР, обеспечивающей одномоментное выявление нескольких возбудителей в одной реакции, сокращение времени и снижение себестоимости лабораторного анализа [1].

Сотрудниками Референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора разработан «Набор реагентов для выявления и дифференциации буркхольдерий группы *«pseudomallei»* в формате мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией «Амплиген Буркхольдерий группы *«pseudomallei»* βL V/D – EPh» по ТУ 21.20.23-014-01898084-2016», предназначенный для обеспечения готовности медицинских организаций к проведению лабораторной диагностики инфекционных болезней, вызванных *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*, в случаях их завоза на территорию Российской Федерации, а также при возникновении чрезвычайных ситуаций.

Благодарности. Выражаем благодарность сотрудникам ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора: к.м.н., зав. отделом биологического и технологического контроля Лобовиковой О.А.; к.м.н., зав. отделом стандартизации, качества и метрологии Шульгиной И.В.; к.м.н. и.о. зав. отделом диагностики инфекционных болезней Портенко С.А.; к.м.н., зав. лабораторией молекулярной диагностики Осинной Н.А.; н.с. лаборатории оперативной диагностики инфекционных болезней Касьян Ж.А. за организацию и проведение испытаний, подтверждающих безопасность и уровень качества медицинского изделия «Амплиген Буркхольдерий группы *«pseudomallei»* βL V/D – EPh» по ТУ 21.20.23-014-01898084-2016».

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Пакскина Н.Д., Брагина И.В., Шенков Н.В., Кутырев В.В. и др. *Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство*. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В. ред. М.: Шико; 2009.
2. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Щелкунов С.В. Биотерроризм как национальная и глобальная угроза. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2000; 6: 83-6.
3. Захарова И.Б., Романова А.В., Тетерятникова Н.Н., Замараев В.С., Викторов Д.В. Молекулярное типирование и анализ полиморфизма генов β -лактамаз патогенных видов *Burkholderia*. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2012; 2 (42): 98-101.
4. Захарова И.Б., Шпак И.М., Тетерятникова Н.Н., Кузюткина Ю.А., Ткаченко Г.А., Лемасова Л.В. и др. *Лабораторный скрининг и идентификация Burkholderia pseudomallei. Практическое руководство*. Топорков А.В., Кузнецова А.Н., Х. Зы Нгуен ред. Волгоград: Волга-Пресс; 2018.
5. Zakharova I., Teteryatnikova N., Toporkov A., Viktorov D. Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia* complex. *Acta Tropica*. 2017; 174: 1-8.

REFERENCES

1. Onischenko G.G., Ejlova E.B., Pakschina N.D., Bragina I.V., Sheenkov N.V., Kutyrev V.V. et al. Laboratory diagnosis of dangerous infectious diseases. Practical guidance. [Laboratory diagnosis-

- tika opasnyih infektsionnyih bolezney: Prakticheskoe rukovodstvo. Onischenko G.G., Kutyrev V.V., eds]. Moscow: Shiko; 2009. (in Russian)
2. Onischenko G.G., Sandahchiev L.S., Netesov S.V., Schelkunov S.V. Bioterrorizm kak natsionalnaya i global'naya ugroza. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2000; 6: 83-6. (in Russian)
3. Zakharova I.B., Romanova A.V., Teteryatnikova N.N., Zamaraev V.S., Viktorov D.V. Molekulyarnoe tipirovanie i analiz polimorfizma genov β -laktamaz patogennyih vidov *Vurkholderia*. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2012; 2 (42): 98-101. (in Russian)
4. Zakharova I.B., Shpak I.M., Teteryatnikova N.N., Kuzyutina YU.A., Tkachenko G.A., Lemasova L.V. et al. Laboratory screening and authentication of *Burkholderia pseudomallei*. Practical guidance. [Laboratory screening i identifikatsiya *Burkholderia pseudomallei*. Prakticheskoe rukovodstvo. Toporkov A.V., Kuznetsova A.N., H. Zyi Nguen, eds.] .Volograd: Volga-Press; 2018. (in Russian)
5. Zakharova I., Teteryatnikova N., Toporkov A., Viktorov D. Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia*. *Acta Tropica*. 2017; 174: 1-8. (in Russian)

Поступила 10.01.19
Принята к печати 04.02.19

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Самойлова М.В.¹, Косырева Т.Ф.¹, Анурова А.Е.¹, Абрамович Р.А.¹, Миронов А.Ю.²,
Жиленкова О.Г.², Затевалов А.М.², Воропаева Е.А.²

ОЦЕНКА МИКРОБИОЦЕНОЗА ПОЛОСТИ РТА НА ОСНОВЕ ГХ-МС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛАЗМАЛОГЕНА И БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» кафедра стоматологии детского возраста и ортодонтии; 117198, Москва, Россия;

²ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского, Роспотребнадзора», Москва, Россия

Изучены концентрации бактериального плазмалогена и эндотоксина в ротовой жидкости у пациентов с различной степенью тяжести заболеваний пародонта, травмой протезного ложа и различной степенью нарушений микробиотеноса полости рта. Определение факта наличия патологического процесса проводилось клинически, по состоянию тканей пародонта. Степень микробиологических нарушений оценивали по количественному соотношению видов микроорганизмов, изолированных из зубодесневового желобка. Выявлено, что концентрация плазмалогена для нормального микробиотеноса составляет не менее 0,7 мкг/г. Для промежуточного типа микробиотеноса определена концентрация 1,82 мкг/г; для дисбиоза – 5,64 мкг/г, для выраженного нарушения микробного состава, сопровождающегося воспалительными процессами – 6,54 мкг/г. Увеличение концентрации бактериального эндотоксина (БЭ) более 6,25 нмоль/г свидетельствует о выраженном воспалительном процессе вне зависимости от определяемой интенсивности обсемененности условно-патогенной грамотрицательной микрофлорой.

Ключевые слова: бактериальный эндотоксин; плазмалоген; предиктивная медицина; газовая хроматография масс-спектрометрия; микробиотенос полости рта; заболевания пародонта.

Для цитирования: Самойлова М.В., Косырева Т.Ф., Анурова А.Е., Абрамович Р.А., Миронов А.Ю., Жиленкова О.Г., Затевалов А.М., Воропаева Е.А. Оценка микробиотеноса полости рта на основе гх-мс-определения плазмалогена и бактериального эндотоксина в ротовой жидкости Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (3): 186-192. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-186-192>

Samoylova M.V.¹, Kosyreva T.F.¹, Anurova A.E.¹, Abramovich R.A.¹, Mironov A.Yu.², Zhilenkova O.G.², Zatevalov A.M.², Voropayeva E.A.²

ORAL CAVITY MICROBIOTENOSIS ASSESSMENT ON THE BASIS OF BACTERIAL ENDOTOXIN AND PLASMALOGENS IN A SALIVA BY METHOD GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

¹Peoples' Friendship university of Russia, Department of paediatric dentistry and orthodontics, Moscow, Russia, 117198;

²G. N. Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology, Rospotrebnadzor, Moscow, Russia

The concentration of plasmalogen bacterial and endotoxin levels in the saliva of patients with different severity of periodontal disease, injury prosthetic bed and with various degrees of the oral cavity microbiotenos violations was studied. Determination of the presence of the pathological process was carried out clinically, according to the condition of periodontal tissues. The degree of microbiological disorders was assessed by the quantitative ratio of the types of microorganisms isolated from the smear taken from the gingival groove. It was found that the concentration of plasmalogen for normal microbiotenos is not less than 0.7 µg/g. For the intermediate type of microbiotenos, the concentration of 1.82 µg/g was determined; for dysbiosis – 5.64 µg/g, and for the expressed violation of the microbial composition accompanied by inflammatory processes – 6.54 µg/g. An increase in the concentration of bacterial endotoxin (be) more than 6.25 nanomole/g indicates the pronounced inflammatory process, regardless of the determined intensity of contamination of opportunistic gram-negative microflora.

Key words: bacterial endotoxin; plasmalogen; predictive medicine; gas chromatography; mass spectrometry; microbiotenos of the oral cavity; periodontal disease.

For citation: Samoylova M.V., Kosyreva T.F., Anurova A.E., Abramovich R.A., Mironov A.Yu., Zhilenkova O.G., Zatevalov A.M., Voropayeva E.A. Oral cavity microbiotenos assessment on the basis of bacterial endotoxin and plasmalogen in a saliva by method GAS-liquid chromatography-mass spectrometry. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (3): 186-192 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-186-192>

For correspondence: Zatevalov A.M., Ph.D. Doctor of Biol. Sci., Chief Research Fellow, Laboratory of Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases; e-mail: 89057149114@mail.ru

Information about authors:

Samoylova M.V. <http://orcid.org/0000-0001-6771-919X>

Kosyreva T.F. <http://orcid.org/0000-0003-4333-5735>

Anurova A.E. <http://orcid.org/0000-0002-2547-55933>

Abramovich R.A. <http://orcid.org/0000-0003-1784-881X>

Mironov A. Yu. <http://orcid.org/0000-0002-8544-5230>

Zhilenkova O. G. <http://orcid.org/0000-0003-3206-6648>

Zatevalov A. M. <http://orcid.org/0000-0002-1460-4361>

Voropaeva E. A. <http://orcid.org/0000-0002-0463-0136>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 09.02.2019

Accepted 20.02.2019

Введение. Одним из наиболее перспективных направлений медицинской науки 21 века признана персонифицированная медицина. Если «реактивная» медицина реагирует на болезнь и борется с её симптомами, то персонифицированная медицина направлена на предотвращение заболеваний, ключевая роль отводится профилактике, индивидуализированному подходу к пациенту, активному участию самого пациента в лечении и профилактике заболеваний. Особое место в персонифицированной медицине занимает предиктивная медицина – поиск биомаркёров заболеваний и выявление синдромов – предвестников заболеваний [1].

Микробиота человека по совокупности клеток больше самого организма в 10 раз. Количество генов микробиоты превышает геном человека в 100 раз. Большая часть микроорганизмов находится в симбиозе с организмом, выполняет защитные функции, способствует формированию колонизационной резистентности и многих других. Важной функцией микробиоценоза является информационная составляющая микробиоты [2].

Количество видов микроорганизмов в полости рта варьирует от 500 до 3500, большинство из которых ещё не описаны и полностью не изучены [3]. Количество микроорганизмов в ротовой жидкости составляет от 43 млн до 5,5 млрд в 1 мл. Интенсивность обсеменённости микроорганизмами зубных бляшек и десневой бороздки в 100 раз выше - примерно 200 млрд. микробных клеток в 1 г пробы (в которой около 80% воды) [1,4]. При наличии воспалительных заболеваний в тканях пародонта происходят количественные и видовые изменения микробиоценоза в сторону уменьшения нормофлоры и резкому увеличению парадонтопатогенов [4].

В полости рта на микроорганизмы действует слюна, механически смывающая бактерии и содержащая антимикробные вещества (лизоцим и др.). В полости рта всегда встречаются биотопы, легко колонизируемые микроорганизмами (например, десневые карманы). В состав микрофлоры полости рта входят различные микроорганизмы, многие из которых некультивируемые [6–8]. Бактериологическим методом можно изолировать не более 1% всех микроорганизмов микробиоценоза полости рта. Описание состояния микробиоценоза по соотношению такого малого количества микроорганизмов не учитывает многих аспектов взаимоотношений микроорганизмов, что отражается на эффективности лечения. Для оценки состояния микробиоценоза необходим системный подход, основанный на новых, более точных физико-химических методах исследования, таких как: газожидкостная хроматография (ГХ) масс-спектрометрия (МС) [9].

Многочисленные клинико-экспериментальные исследования позволяют рассматривать бактериальные эндотоксины как основные факторы, индуцирующие

развитие синдрома интоксикации при инфекционных и неинфекционных заболеваниях. Липополисахарид (ЛПС) является мощным структурным компонентом грамотрицательных бактерий, с его действием на организм связывают все объективные клинические проявления интоксикации. Активация иммунокомпетентных клеток ЛПС ведёт к выбросу воспалительных медиаторов: цитокинов, хемокинов, ферментов, эйкозаноидов, адгезивных молекул, свободных радикалов, ответственных за развитие воспалительных реакций и способных вызывать патофизиологические процессы, включая септический шок. Разработаны и используются различные методы определения эндотоксина в биологических средах, основанные, как на детекции его серологических маркёров, так и на регистрации вызываемых им биологических эффектов [9].

Развитие воспалительного процесса в пародонте связано с влиянием метаболитов и ферментов живых и лизированных бактерий, которые попадают в десневую жидкость и обладают агрессивными свойствами по отношению к коллагену, гликозаминогликанам и другим составляющим пародонта. Конечные продукты обмена веществ бактерий, в частности аммиак, индол, скатол, сероводород, сероуглерод поражают ткани пародонта. Липополисахариды из стенок грамотрицательных микроорганизмов индуцируют локальную иммунную реакцию тканей, что сопровождается усилением высвобождения иммунных комплексов, лизосомальных ферментов, декстриназ и прочее, оказывающих разрушающее действие как на эмаль зуба, так и на ткани пародонта [4].

Одним из наиболее значительных компонентов, оказывающих положительное влияние на симбиоз организма и микробиоты, является плазмалоген. Глицерофосфолипиды, имеющие алкен-1-иль-ноэфирную группировку и являющиеся производными высших жирных альдегидов называют плазмалогенами. Плазмалогены обнаружены в тканях и органах всех животных, независимо от уровня их организации. В достаточно высокой концентрации плазмалогены присутствуют в организме человека, где они составляют около 22% от общего количества фосфолипидов. Особенно велико содержание плазмалогенов в нервной ткани, головном мозге (белое вещество, мозговая оболочка), сердечной мышце, надпочечниках, сперме. В меньшей степени плазмалогены представлены в микроорганизмах и растениях. Плазмалоген содержится в мембранах анаэробных микроорганизмов, которые являются резервуаром этого необходимого организму компонента [9].

Оценка микробиоценозов методами ГХ-МС в парадигме предиктивной медицины приобретает популярность у исследователей вследствие высокой специфичности и чувствительности метода, возможности

интегральной характеристики реактивности микробно-тканевого комплекса. Оценка микробиоценозов бактериологическим методом может быть расширена за счёт дополнительных данных по концентрации плазмалогена и бактериального эндотоксина в ротовой жидкости.

Цель работы – определение в ротовой жидкости уровней плазмалогена и бактериального эндотоксина характерных для нормы и микробиологических нарушений разной степени тяжести.

Материал и методы. Исследованы концентрации плазмалогена и бактериального эндотоксина в ротовой жидкости у 45 пациентов в возрасте 25-60 лет, обратившихся за стоматологической помощью в ГАУЗ поликлинику № 66 г. Москвы и клинику «Профессионал», за 3 года - с 2014 по 2016 г, с целью ортопедического лечения частичного вторичного отсутствия зубов и профилактики острой травмы протезного ложа, имеющих различную степень тяжести заболеваний пародонта.

Отбор пациентов проводили на основании клинико-морфологического статуса, данных рентгенологического исследования (ортопантограммы) и лабораторного обследования. При клиническом осмотре в начале исследования и при повторных осмотрах фиксировались исходные показатели, характеризующие наличие зубного налёта, состояние тканей пародонта с помощью индексов API, PMA, SBI. Дополнительно проводились анализы ротовой жидкости и венозной крови.

Микробиологические исследования проводились в соответствии с рекомендациями МЗ РФ [Приложение 1 к приказу МЗ СССР № 535 от 22.04.1985 г. «Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях»]. Исследуемый материал засеивали на основные и дифференциально-селективные питательные среды для выделения и идентификации микроорганизмов.

Исследуемый материал (ротовая жидкость) брали утром, строго натощак стерильным тампоном-зондом, и помещали в коллекторы с транспортной средой Amies, содержащей фармакологический активированный уголь, для доставки в лабораторию.

Идентификацию микрофлоры проводили на основании изучения морфологических, культуральных, ферментативных и антигенных свойств с использованием тест-систем производства «PLIVA-LachemaDiagnostika, s.r.o.» (Чешская Республика) и согласно руководству [10].

Степень нарушения микробиоценоза полости рта оценивалась по ФКР (2016) [11].

По итогам клинического и лабораторного обследования, и микробиологического анализа ротовой жидкости определены 4 группы: N – «нормоценоз»; I - промежуточный тип микробиоценоза; II – дисбиоз полости рта; III - выраженный воспалительный процесс. Отмечалось что у пациентов группы «Нормоценоз» и «Промежуточный тип микробиоценоза» отсутствовали воспалительные заболевания пародонта, у пациентов группы «Дисбиоз» обнаруживали хронический катаральный гингивит, у пациентов группы «Выраженный воспалительный процесс» диагностировали хронический генерализованный пародонтит.

Определение концентрации бактериального плазмалогена и эндотоксина в ротовой жидкости проводили методом ГХ-МС. Анализ состоял в прямом извлечении с помощью экстракции жирнокислотных соединений

из образцов. Разделение проводили на хроматографе МАЭСТРО 7820А, совмещенным с квадрупольным селективным масс-спектрометром Adgent Technologies 5975 с диапазоном масс 2-1000 аем, имеющем разрешающую способность 0,5 аем во всём рабочем диапазоне. Чувствительность прибора 50 пг (пикограмм) по метилстеарату в режиме непрерывного сканирования и 1 пг в режиме селективных ионов, на капиллярной колонке с метилсиликоновой привитой фазой Ультра-1 Хьюлетт-Паккард длиной 25 м и внутренним диаметром 0.2 мм. Режим анализа 120° С - 2 мин, далее программированное изменение температуры - 5 град/мин до 300-320° С град. При определении состава основных липидных компонентов, карбоновых, фенилкарбоновых кислот и спиртов пробы использован режим полного сканирования [12].

Пробоподготовка для изучения состава микробных маркёров осуществлялась по методике приведенной в статье [12].

Вещества на хроматограмме определяли по масс-спектрам, используя стандартную программу идентификации прибора, основанную на базе данных NBS.

По концентрации пальмитового альдегида в ротовой жидкости определяли содержание бактериального плазмалогена - главного липидного компонента клеточных мембран. Концентрацию бактериального эндотоксина рассчитывали как сумму концентраций отдельных компонентов клеточной стенки грамотрицательных микроорганизмов [13].

Полученные выборки для определённых степеней микробиологических нарушений оценивали на наличие нормального распределения по критерию Шапро-Вилсона. В связи с отсутствием нормального распределения различия медианных средних значений выборок и интерквартильный размах сравнивали по U-критерию Манна-Уитни. Пороговые значения бактериального эндотоксина для пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом и с менее тяжёлыми нарушениями состояния микробиоценоза полости рта определяли ROC-анализом с построением ROC-кривой, расчётом площади под кривой (AUC) и порога отсечения CutOff. Пороговое значение концентрации бактериального эндотоксина определяли по значению CutOff. При анализе значение $p < 0,05$ принималось как статистически значимое различие.

Результаты и обсуждение. По результатам оценки клинических данных о состоянии полости рта и пародонта, с учётом данных бактериологического исследования пациенты отнесены к группам «Нормоценоз», «Промежуточный тип», «Дисбиоз», «Выраженный воспалительный процесс». Всю выборку и подгруппы оценили на наличие нормального распределения по критерию Шапро-Вилсона. Нормальное распределение не было ни в одной из подгрупп. Для статистического описания групп использовали медианные значения для оценки средних и интерквартильный интервал для оценки разброса. Результаты анализа по определению концентрации плазмалогена в ротовой жидкости представлены на рис. 1.

На рис. 1 показано, что с увеличением степени микробиологических нарушений увеличивается концентрация бактериального плазмалогена в ротовой жидкости. Анализ достоверности различий по U-критерию Манна-Уитни показал достоверное отличие на уровне более 95% между I и II группой, между II и III группой, а

Качественная характеристика оценки воспалительного процесса при пародонтите по концентрации бактериального эндотоксина

| Параметр | Значение |
|---|----------|
| AUC (Площадь ограниченная ROC-кривой) | 0,922 |
| CutOff (Порог отсечения) | 0,245 |
| Пороговая концентрация бактериального эндотоксина, наномоль/г | 6,25 |

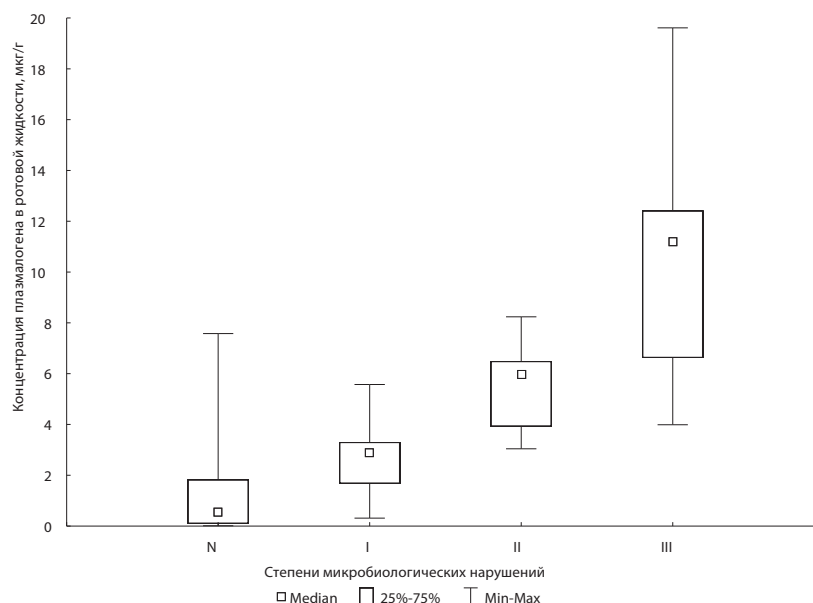


Рис. 1. Концентрация плазмалогена в ротовой жидкости при различных степенях микробиологических нарушений. Здесь и на рис. 2: N – нормоценоз; I – промежуточный тип; II – дисбиоз; III – выраженный воспалительный процесс.

так же между I и III группой. Увеличение концентрации бактериального плазмалогена связано с увеличением интенсивности обсеменённости микроорганизмами, которое соответствует увеличению степени микробиологических нарушений. Метод определения бактериального плазмалогена ГХ-МС оценивает его концентрации по концентрации пальмитового альдегида, производимого бактериальной микрофлорой. График (рис. 1) указывает на увеличение интенсивности обсеменённости ротовой полости при увеличении степени микробиологических нарушений микробиоценоза полости рта.

Концентрация плазмалогена для нормального микробиоценоза составляет не менее 1,7 мкг/г. Для промежуточного типа микробиоценоза определена концентрация 3,2 мкг/г; для дисбиоза – 6,24 мкг/г, для выраженного воспалительного процесса выше 6,54 мкг/г.

Концентрация бактериального эндотоксина в ротовой жидкости представлена на рис. 2. На рис. 2 показано увеличение концентрации бактериального эндотоксина с увеличением степени тяжести микробиологических нарушений в полости рта. Установлено достоверное (более 95%) увеличение концентрации бактериального эндотоксина в III группе относительно N, I, II групп. Для определения пороговой концентрации бактериального эндотоксина, определяемого ГХ-МС проведён ROC-анализ концентраций бактериального эндотоксина у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом и пациентов других групп (рис. 3, см. таблицу).

Данные ROC-анализа указывают на высокую прогностическую ценность концентрации бактериального эндотоксина, определяемого ГХ-МС при заболевании пародонтитом. Определено значение точки отсечения (CutOff), по которому рассчитана пороговая концентрация бактериального эндотоксина равная 6,25 наномоль/г. При концентрации бактериального эндотоксина выше пороговой концентрации можно утверждать о наличии эндотоксиновой агрессии, связанной с высокой интенсивностью обсеменённости грамотрицательной микрофлорой.

Микрофлора является резервуаром плазмалогена, который входит в состав мембран анаэробных бактерий. Плазмалоген является протектором в окислении полиненасыщенных жирных кислот, участвует в управлении выбросом холестерина из клеток. Плазмалоген важен для поддержания нормальной деятельности нервной системы человека, так как стимулирует нервные клетки, осуществляет межклеточные сигнальные функции. Накопление плазмалогена связано с увеличением интенсивности обсеменённости и является способствующим фактором для симбиоза организма и его микрофлоры. Концентрация плазмалогена в слюне зависит от множества факторов: от продукции плазмалогена микрофлорой, от интенсивности его всасывания слизистой и от выделения его организмом.

Из представленных данных (см. рис. 2) можно отметить скачкообразное увеличение концентрации бактери-

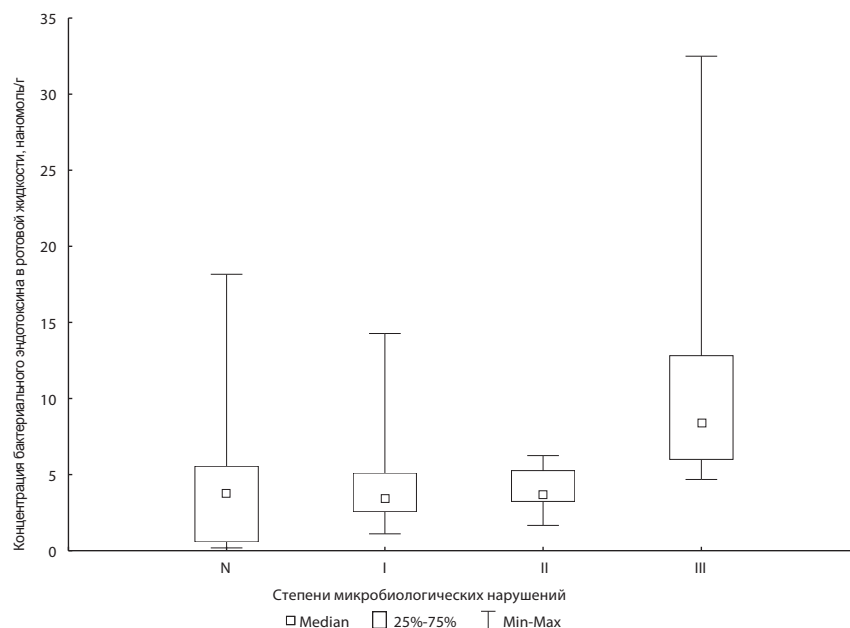


Рис. 2. Концентрация бактериального эндотоксина в ротовой жидкости при различных степенях микробиологических нарушений.

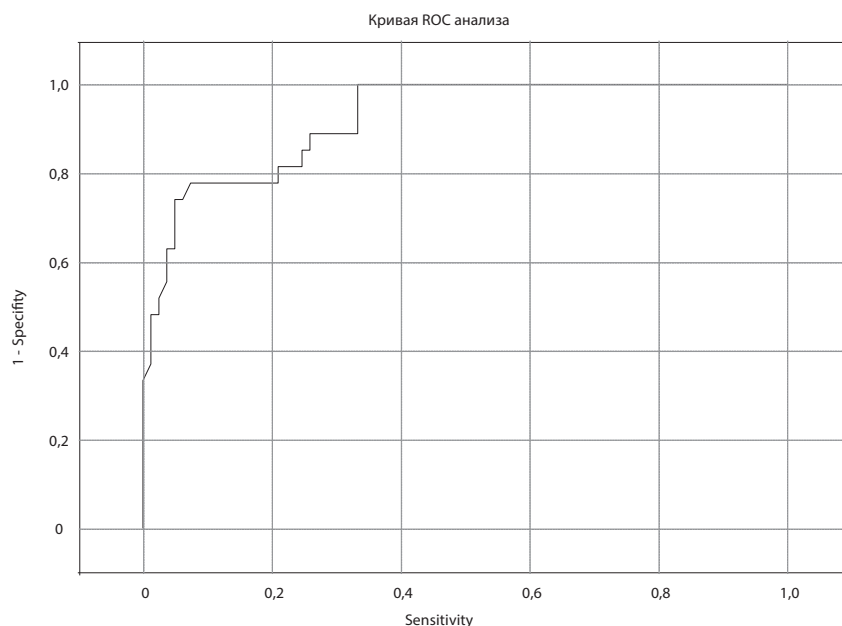


Рис. 3. График ROC-кривой по значениям концентрации бактериального эндотоксина в ротовой жидкости при выраженном воспалительном процессе у пациентов с пародонтитом.

ального эндотоксина при хроническом генерализованном пародонтите. Увеличение концентрации бактериального эндотоксина в ротовой жидкости свидетельствует об увеличении интенсивности обсеменённости грамотрицательной микрофлорой. Умеренная активация клеток при низких дозах эндотоксина с увеличением дозы переходит в гиперактивацию, которая сопровождается усиленной продукцией воспалительных цитокинов, усиленной активацией системы комплемента и факторов свертывания крови, что может заканчиваться развитием таких грозных

осложнений, как диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС), эндотоксиновый шок, острая полиорганная недостаточность [13]. При избыточном поступлении в системный кровоток эндотоксина в условиях относительной недостаточности ЛПС-связывающих факторов, при недостаточности ЛПС выделяющих систем (в первую очередь почек) эндотоксин может проявлять свои разнообразные патогенетические свойства. Факт участия избытка ЛПС в патогенезе различных заболеваний, назван «эндотоксиновой агрессией».

Многие грамотрицательные микроорганизмы некультивируемые или для их выделения необходимо использовать специальные среды и создавать особые условия культивирования. Интегральная характеристика выраженного воспалительного процесса полости рта с помощью оценки концентрации бактериального эндотоксина является более чувствительной и специфичной.

В настоящем исследовании установлено, что для микробиоценоза полости рта, не имеющего выраженного воспалительного процесса, связанного с пародонтитом, концентрация бактериального эндотоксина не превышает 6,25 нмоль/г. Изменение концентрации бактериального эндотоксина не имеет достоверных различий, выраженных тенденций к росту или снижению в группах норма, промежуточный тип, дисбиоз. Значимое изменение концентрации бактериального эндотоксина в 3 раза и более отмечается при выраженном воспалительном процессе в тканях пародонта.

Заключение. С увеличением тяжести заболеваний пародонта и увеличением степени микробиологических нарушений полости рта увеличивается концентрация бактериального плазмалогена и эндотоксина. Резкое увеличение концентрации бактериального эндотоксина отмечается при выраженном воспалительном процессе.

Увеличение концентрации бактериального эндотоксина более 6,25 нмоль/г свидетельствует о выраженном воспалительном процессе вне зависимости, от определяемой культуральным методом, интенсивности обсеменённости условно-патогенной грамотрицательной микрофлорой. Это связано с тем, что многие условно-патогенные микроорганизмы некультивируемые или требуют создания особых условий культивирования. Определение наличия условно-патогенной микрофлоры по содержанию БЭ методом ГХ-МС является более чувствительным методом.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

ЛИТЕРАТУРА

1. Лазебник Л. Б., Стефанюк О. Концепция развития европейского здравоохранения до 2040 года — взгляд в будущее. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015; 117 (5): 51-7.
2. Миронов А. Ю., Зур Н. В. Молекулярные маркеры патогенов. М.: ООО «Тираж»; 2013.
3. Зеленова Е.Г., Заславская М.И., Салина Е.В., Рассанов С.П. Микрофлора полости рта: норма и патология. Учебное пособие. Нижний Новгород: НижГМА; 2004.
4. Григорьян А.С. Болезни пародонта. Патогенез, диагностика, лечение: руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агентство; 2004.
5. Анурова А.Е., Величко Э.В., Косырева Т.Ф., Стуров Н.В. Влияние микрофлоры полости рта матерей на формирование микробиоценоза полости рта у детей с врождёнными расщелинами верхней губы и неба. *Трудный пациент*. 2017; 1-2 (15): 59-62.
6. Борисова, О. Ю., Алёшкин В.А., Пименова А.С. Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Гуров А.В., Шадрин Г.Б., Товмасын А.С., Ефимов Б.А., Кафарская Л.И. Микробный состав микрофлоры ротоглотки у больных с тонзиллярной патологией. *Инфекция и иммунитет*. 2015; 5 (3): 225–32.
7. Феклисова Л.В., Мескина Е.Р., Воропаева Е.А., Пожалостина Л.В., Моисеева К.Д. Микробиоценоз ротоглотки и кишечника у

- детей, посещающих дошкольные учреждения. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2007; 4: 14-9.
8. Ткаченко Е.И., Успенский Ю.П. Питание, микробиоценоз и интеллект человека. СПб.: СпецЛит, 2006.
9. Осипов Г.А., Федосова Н.Ф., Лядов К.В. Количественный in situ микробиологический анализ по липидным маркерам в биологических жидкостях с использованием метода газовой хроматографии – масс спектрометрии. *Здравоохранение и медицинские технологии*. 2007; 5:20-3.
10. Методики клинических лабораторных исследований. Справочное пособие в 3-х томах. Меньшиков В.В., ред. М.: ООО «Лабора»; 2009.
11. Алёшкин В. А., Селькова Е. П., Затевалов А. М., Миронов А. Ю., Волчецкий А. Л., Гудова Н. В. Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника. Федеральные клинические рекомендации. Н. Новгород.: «Ремедиум Приволжье»; 2016.
12. Осипов Г.А. Способ определения родového (видового) состава ассоциации микроорганизмов. Патент РФ 2086642; 1997.
13. Платонова А.Г., Осипов Г.А., Бойко Н.Б., Кириллова Н.В., Родионов Г.Г. Хромато-масс-спектрометрическое исследование микробных жирных кислот в биологических жидкостях человека и их клиническая значимость. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 12. 46-55.

REFERENCES

1. Lazebnik L. B., Stefanyuk O. The concept of the development of European health care until 2040 - a look into the future. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya gastroehnterologiya*. 2015; 117 (5):51–7. (in Russian)
2. Mironov A. Yu., Zur N. V. Molecular Markers of Pathogens [Molekulyarnye markyory patogenov]. Moscow: ООО Tirazh; 2013. (in Russian)
3. Zelenova E.G., Zaslavskaya M.I., Salina E.V., Rassanov S.P. Oral microflora: norm and pathology. Tutorial. [Mikroflora polosti rta: norma i patologiya. Uchebnoye posobiye].Nizhniy Novgorod: Nizhegorodskaya gosudarstvennaya meditsinskaya akademiya; 2004. (in Russian)
4. Grigor'yan A.S. Periodontal disease. Pathogenesis, diagnosis, treatment: a guide for doctors.[Bolezni parodonta. Patogenez, diagnostika, lechenie: rukovodstvo dlya vrachey].M: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2004. (in Russian)
5. Anurova A.E., Velichko E.H.V., Kosyрева T.F., Sturov N.V. Influence of the microflora of the oral cavity of mothers on the formation of the microbiocenosis of the oral cavity in children with congenital clefts of the upper lip and palate. *Tрудnyj patsient*. 2017; 1-2(15): 59-62. (in Russian)
6. Borisova O. YU., Aleshkin V.A., Pimenova A.S., Kryukov A.I., Kunel'skaya N.L., Gurov A.V., SHadrin G.B., Tovmasyan A.S., Efimov B.A. Kafarskaya, L.I. Microbial composition of the oropharyngeal microflora in patients with tonsillar pathology. *Infektsiya i immunitet*. 2015; 5. (3): 225–32. (in Russian)
7. Feklisova L.V., Meskina E.R., Voropaeva E.A., Pozhalostina L.V., Moiseeva K.D. Microbiocenosis of the oropharynx and intestines in children attending preschool institutions. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2007; 4: 14–9. (in Russian)
8. Tkachenko E.I., Uspenskij YU.P. Nutrition, microbiocenosis and human intelligence. [Pitanie, mikrobiotsenoz i intellekt cheloveka]. St.Petersburg.: SpetsLit; 2006. (in Russian)
9. Osipov G.A, Fedosova N.F., Lyadov K.V. Quantitative in situ microbiological analysis of lipid markers in biological fluids using gas chromatography - mass spectrometry. *Zdravoohranenie i meditsinskie tekhnologii*. 2007; 5: 20-3. (in Russian)
10. Methods of clinical laboratory research. Reference manual in 3 volumes. [Metodiki klinicheskikh laboratornyh issledovaniy Spravochnoe posobie v 3-h tomakh]. Men'shikov V.V., ed. Moscow: Labora; 2009. (in Russian)
11. Alyoshkin V. A., Sel'kova E. P., Zatevalov A. M., Mironov A. Yu., Volcheckiy A. L., Gudova N. V. Determination of dysbiotic changes in the gastrointestinal tract by markers of intestinal contents. Federal clinical guidelines. [Opredelenie disbioticheskikh izmenenij zhelu-

- dochno-kishechnogo trakta po markyoram sodержimogo kischechnika Federalnye klinicheskie rekomendacii]. Nizhniy Novgorod: Remedium Privolzh'e; 2016. (in Russian)
12. Osipov G. A. The method for determining the generic (species) composition of the association of microorganisms. [Sposob opredeleniya rodovogo vidovogo sostava asociacii mikroorganizmov]. Patent RF 2086642; 1997. (in Russian)
13. Platonova A.G., Osipov G.A., Boyko N.B., Kirillova N.V., Rodionov G.G. Chromato-mass spectrometric study of microbial fatty acids in human biological fluids and their clinical significance. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 12. 46-55. (in Russian)

Поступила 09.02.19
Принята к печати 20.02.19

Уважаемые читатели!

На сайте Научной Электронной Библиотеки
www.elibrary.ru можно подписаться на электронную версию
нашего журнала и других журналов издательства «Медицина» на 2019 год.

Архив журналов Издательства «Медицина»
находится в открытом (бесплатном) доступе на сайтах
Научной электронной библиотеки **www.elibrary.ru**
и Киберленинки **www.cyberleninka.ru**

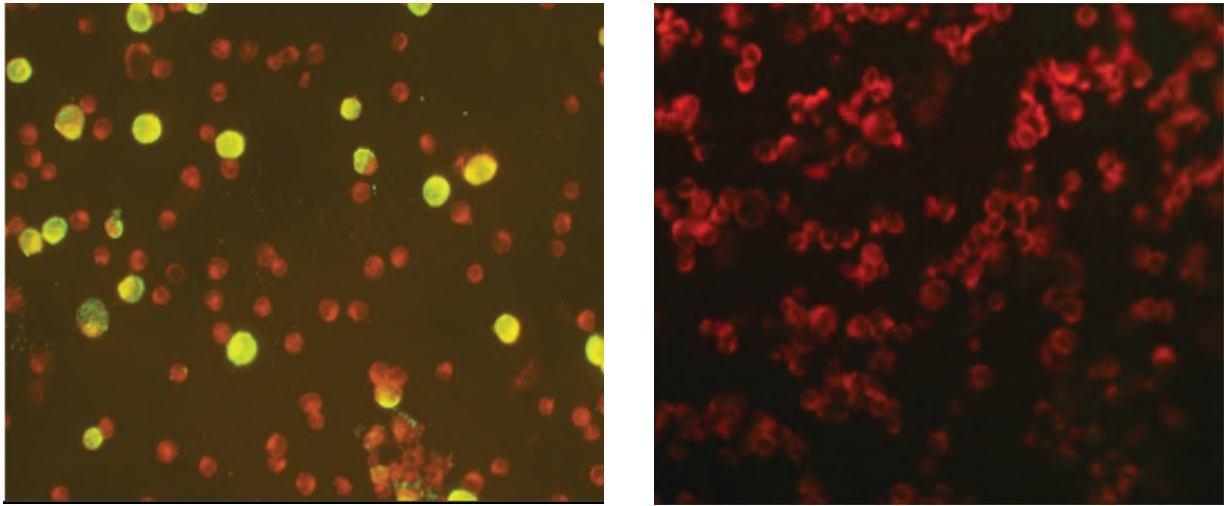


Рис.1. Результаты исследования образцов в реакции иммунофлюоресценции (РИФ).
a – положительный результат РИФ; *б* – отрицательный результат РИФ.

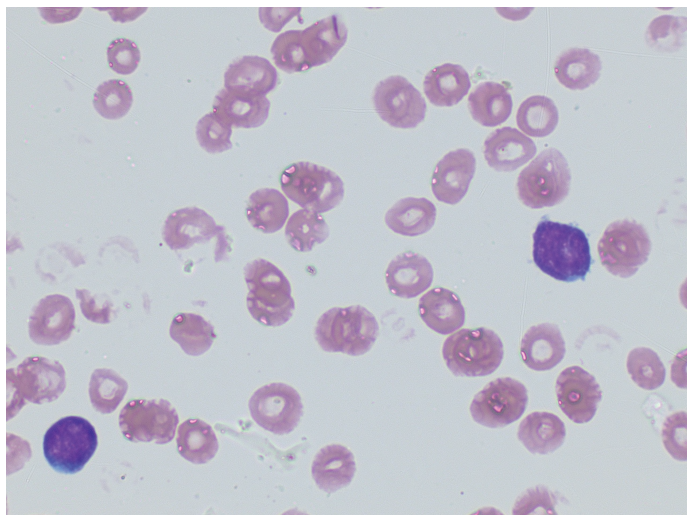


Рис. 1. Микроскопическое исследование мазков периферической крови (окраска по Паппенгейму). Бластные клетки мелких и средних размеров, с ядрами округлой и неправильной форм, нежно-сетчатой структурой хроматина, узкой светло-базофильной цитоплазмой, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. В части бластных элементов выявляются нечеткие нуклеолы (ок.10, об. x100).

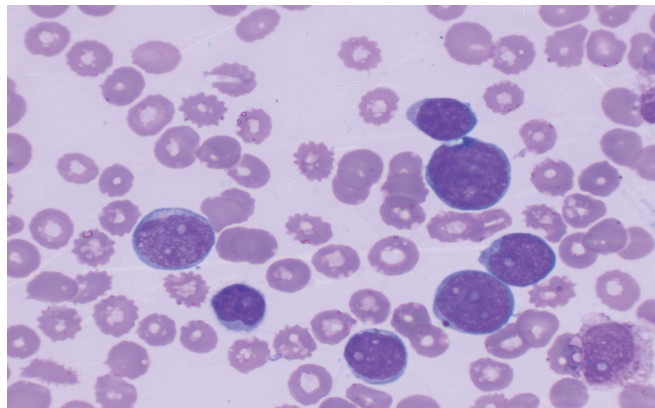
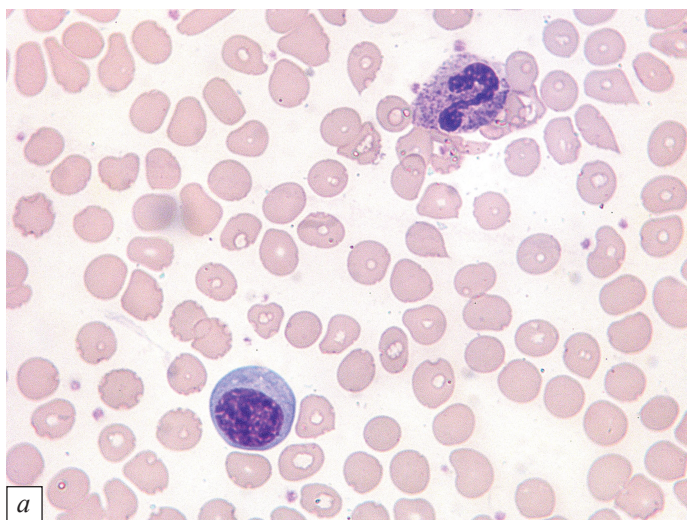
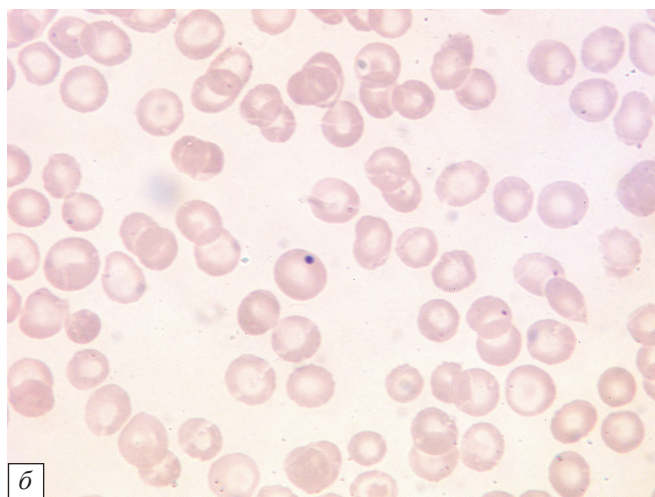


Рис. 2. Микроскопическое исследование мазков периферической крови (окраска по Паппенгейму). Бластные клетки средних размеров, с округлой и неправильной формами ядер, нежно-сетчатой структурой хроматина, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, четкими ядрышками в большинстве бластов, узкой светло-базофильной беззернистой цитоплазмой (ок.10, об. x100).



а



б

Рис.3 . Микроскопическое исследование мазков периферической крови (окраска по Паппенгейму). А - выявляются крупные лимфоидные клетки с эксцентрично расположенными ядрами округлой и неправильной форм, с омоложенной структурой хроматина, широкой базофильной цитоплазмой со светлой перинуклеарной зоной по типу атипичных мононуклеаров. Б - в отдельных эритроцитах встречались включения в виде телец Хауэлла-Жолли (ок.10, об. x100).

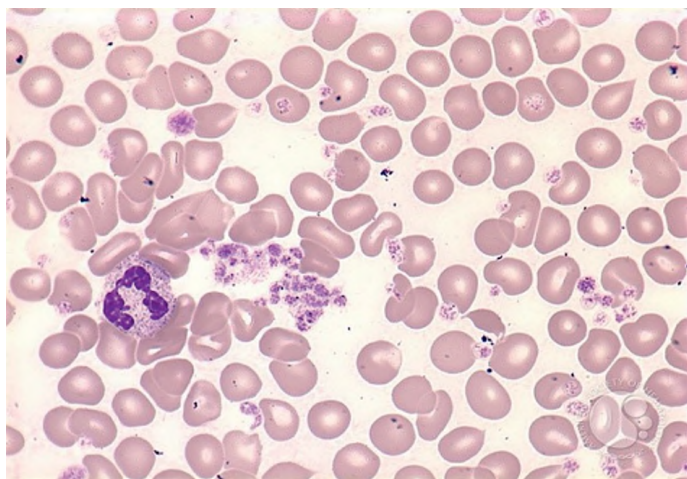


Рис. 4. Микроскопическое исследование мазков периферической крови (окраска по Паппенгейму). Скопления тромбоцитов в виде небольшого агрегата, встречаются отдельно лежащие макрофогры тромбоцитов (ок.10, об. x100).