

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 64

4 • 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

АПРЕЛЬ

Журнал основан в январе 1955 г.

Почтовый адрес

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

Телефон редакции:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Зав. редакцией Л. А. Шанкина

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. № 4. 193–256.

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"»

ОАО ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA iagnostika

Volume 64
4 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

APRIL

The Journal is founded in 1955.

**Mailing address:
Izdatelstvo "MEDITSINA"**

115088, Moscow
Novoostapovskaya str., 5, building 14

Editorial office phone:

8-495-430-03-63,

E-mail: clin.lab@yandex.ru

Managing editor L.A. Shankina

ADVERTISING DEPARTMENT

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

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. MAZYZTOV (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), E.N. OVANESOV (*Moscow*), Yu.V. PERVUCHIN (*Stavropol'*), I.V. PICALOV (*Novosibirsk*), Yu.P. REZNIKOV (*Moscow*), D.B. SAPRIGIN (*Moscow*), S.N. SUPLOTOV (*Tyumen'*), O.A. TARASENKO (*Moscow*), I.S. TARTAKOVSKYI (*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*)



ИЗДАТЕЛЬСТВО "МЕДИЦИНА"

БИОХИМИЯ

Муркамилов И.Т., Сабиров И.С., Фомин В.В., Айтбаев К.А., Муркамилова Ж.А., Райимжанов З.Р., Реджапова Н.А., Юсупов Ф.А. Двусторонние кардиоренальные взаимоотношения в организме пациентов при нефротическом синдроме 196

Бельская Л.В., Сарф Е.А., Соломатин Д.В. Количественное определение содержания липидов в биологическом материале методом инфракрасной спектроскопии 204

ГЕМАТОЛОГИЯ

Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В., Соменова О.В., Елизарова А.Л., Добровольская М.М., Харитиди Т.Ю., Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е., Бобрышев А.А., Кононенко И.Б., Снеговой А.В. Разработка стратегических подходов к современной диагностике анемического синдрома у больных раком молочной железы 210

Кузьмичева В.И., Пильмиyarова Ф.Н., Колотьева Н.А., Кецо Ю.Л., Гусякова О.А., Кузнецова О.Ю., Горбачева И.В. Группа крови как предиктор гликемии и лактаемии у пациентов в критическом состоянии 216

Йовдий А.В., Бутина Е.В., Попонина Е.А., Зайцева Г.А., Минаева Н.В. Интерпретация результатов иммуногематологических исследований у пациентов гематологической клиники ... 221

ЦИТОЛОГИЯ

Путова М.В., Носкова К.К., Поморцев Б.А., Семенов Н.Е., Израйлов Р.Е. Цитологическая диагностика интраоперационных перитонеальных смывов при раке желудка 225

Петрашова Д.А. Цитогенетические особенности буккального эпителия у школьников старшего возраста, проживающих в высоких и средних широтах 229

ИММУНОЛОГИЯ

Шахвердиева И.Д., Гулиев М.Р., Нариманова Г.В., Керимова И.А. Изменение цитокинового профиля в крови беременных с анемией 234

Бочкарева С.С., Караулов А.В., Аleshкин А.В., Новикова Л.И., Федорова И.М., Бляхер М.С., Котелева С.И., Капустин И.В. Методические подходы к оценке некоторых параметров гуморального и клеточного иммунного ответа на бактериофаги 237

Логинова М.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Черанев В.В., Парамонов И.В. Особенности распределения HLA-аллелей и гаплотипов в популяции калмыков 243

МИКРОБИОЛОГИЯ

Булгакова С.В., Тренева Е.В., Захарова Н.О., Труханова И.Г. Кишечная микробиота: связь с возраст-ассоциированными заболеваниями (обзор литературы) 250

BIOCHEMISTRY

Murkamilov I.T., Sabirov I.S., Fomin V.V., Aitbaev K.A., Murkamilova Zh.A., Rayimjanov Z.R., Redjapova N.A., Yusupov F.A. Bilateral impact of cardiorenal relationships in the nephrotic syndrome

Bel'skaya L.V., Sarf E.A., Solomatin D.V. Determination of the quantitative content of lipids in a biological material by the method of ir spectroscopy

HEMATOLOGY

Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V., Somonova O.V., Elizarova A.L., Dobrovolskaya M.M., Kharitidi T.Yu., Lyubimova N.V., Kushlinsky N.E., Bobryshev A.A., Kononenko I.B., Snegovoy A.V. The development of the strategic approaches to modern diagnosis of anemic syndrome in patients with breast cancer

Kuzmicheva V.I., Gylmiyarova F.N., Koloteva N.A., Ketsko Yu.L., Gusyakova O.A., Kuznetsova O.Yu., Gorbacheva I.V. Blood group as a predictor of glycemia and lactatemia in critical condition patients

Yovdiy A.V., Butina E.V., Poponina E.A., Zaitseva G.A., Minaeva N.V. Interpretation of the results of immunohematological tests in hematological patients

CYTOLOGY

Putova M. V., Noskova K. K., Semenov N. E., Pomortsev B. A., Izrailov R. E. Cytological diagnostics of intraoperative peritoneal washes in gastric cancer

Petrashova D.A. Buccal epithelium cytogenetic status in school-children living in high and middle latitudes

IMMUNOLOGY

Shahverdiyeva I.J., Guliyev M.R., Narimanova G.V., Kerimova I.A. Changes of cytokine profile in the blood of pregnant women with anemia

Bochkareva S.S., Karaulov A.V., Aleshkin A.V., Novikova I.I., Fedorova I.M., Blayaher M.S., Koteleva S.I., Kapustin I.V. Approaches to the estimation of some parameters of humoral and cellular immune response to bacteriophages

Loginova M.A., Kutyavina S.S., Smirnova D.N., Cheranev V.V., Paramonov I.V. Features of distribution HLA-alleles and haplotypes in kalmyks

MICROBIOLOGY

Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O., Trukhanova I.G. Intestinal microbiota: relationship to age-associated diseases (review of literature)

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Муркамилов И.Т.^{1,2}, Сабиров И.С.², Фомин В.В.³, Айтбаев К.А.⁴, Муркамилова Ж.А.⁵,
Райимжанов З.Р.^{1,6}, Реджапова Н.А.⁷, Юсупов Ф.А.⁷

ДВУСТОРОННИЕ КАРДИОРЕНАЛЬНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ ПАЦИЕНТОВ ПРИ НЕФРОТИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

¹Кыргызская государственная медицинская академия им. И.К. Ахунбаева, 720020, г. Бишкек, Кыргызстан;
²ГОУ ВПО «Кыргызско-Российский Славянский университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», 720000, г. Бишкек, Кыргызстан;
³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Москва, Россия;
⁴Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и медицины, 720040, г. Бишкек, Кыргызстан;
⁵Центр семейной медицины № 7, 720040, г. Бишкек, Кыргызстан;
⁶ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь им. акад. Н.Н. Бурденко» Минобороны РФ, 105229, Москва, Россия;
⁷Ошский государственный университет, 714000, г. Ош, Кыргызстан

Цель исследования - оценить и проанализировать двусторонние кардиоренальные взаимоотношения при нефротическом синдроме с учетом гендерных различий. Обследовано 272 пациент с нефротическим синдромом (НС) в возрасте от 16 до 65 лет. Всем больным проведено общеклиническое обследование, электро-и эхокардиография, оценены гематологические и биохимические показатели крови. НС определяли при суточной протеинурии более 3,5 г/1,73м² в сутки, гипоальбуминемии (альбумин менее 30 г/л) и гиперлипидемия (содержание общего холестерина более 5,1 ммоль/л). Длительность НС составляла от 3-х и более месяцев. В зависимости от пола общая выборка (n=272) разделена на две подгруппы: 1-я подгруппа – пациентки с НС женского пола (n=88), 2-я подгруппа - лица мужского пола с НС (n=184). Средние показатели систолического, диастолического, пульсового и среднего артериального давления (АД), достоверно выше у больных НС мужского пола (p<0,05). Существенно чаще регистрировали наджелудочковую и желудочковую эктопическая активность у лиц мужского пола. В подгруппе женщин с НС достоверно чаще выявляли синусовую тахикардию, замедление проведение импульса по ножкам пучка Гиса и нарушение процессов реполяризации левого желудочка (p<0,05). Конечные систолические и диастолические размеры левого желудочка (ЛЖ), толщина межжелудочковой перегородки и задней стенки ЛЖ, диаметр аорты, продольный размер левого предсердия и правого желудочка - существенно больше в группе лиц мужского пола с НС. Достоверно более низкие концентрации гемоглобина, гематокрита, числа эритроцитов отметили в группе лиц женского пола с НС, по сравнению с мужчинами (p<0,05). В когорте мужчин с НС наблюдали существенное снижение содержания общего белка сыворотки крови (44,8±11,0 г/л против 49,2±11,2 г/л; p=0,003) по сравнению с лицами женского пола. В подгруппе мужчин НС концентрация креатинина сыворотки крови [97 (81;143) мкмоль/л против 86 (68;123) мкмоль/л; p=0,005] и степени суточной экскреции белка [6,490 (4,865;9,661) гр против 5,585 (4,168;7,625) гр; p=0,034] с мочой достоверно выше, по сравнению с подгруппой женского пола (табл.2). Одновременно, в когорте мужчин с НС отмечено существенное снижение расчетной скорости клубочковой фильтрации [62,3 (46,2;114,9) мл/мин против 87,0 (67,7;127,5) мл/мин; p=0,002]. При НС у лиц женского пола факторами ухудшения кардиоренальных взаимоотношений являются анемия, синусовая тахикардия, замедление проведения импульса по ножкам пучка Гиса. Тогда как, в подгруппе мужчин НС негативными факторами кардиоренальных взаимоотношений служат гипопропротеинемия, повышения систолического, диастолического, пульсового и среднего АД, концентрации креатинина и величины суточной протеинурии при снижении скорости клубочковой фильтрации и увеличении линейных размеров сердца.

Ключевые слова: нефротический синдром; кардиоренальные взаимоотношения; факторы риска; протеинурия; ренин-ангиотензин-альдостероновая система; гендерные различия.

Для цитирования: Муркамилов И.Т., Сабиров И.С., Фомин В.В., Айтбаев К.А., Муркамилова Ж.А., Райимжанов З.Р., Реджапова Н.А., Юсупов Ф.А. Двусторонние кардиоренальные взаимоотношения в организме пациентов при нефротическом синдроме. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (4):196-203. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-196-203>

Murkamilov I.T.^{1,2}, Sabirov I.S.², Fomin V.V.³, Aitbaev K.A.⁴, Murkamilova Zh.A.⁵, Rayimjanov Z.R.^{1,6}, Redjapova N.A.⁷, Yusupov F.A.⁷

BILATERAL IMPACT OF CARDIORENAL RELATIONSHIPS IN THE NEPHROTIC SYNDROME

¹The I.K. Akhunbaiev Kirghiz State Medical Academy, 720020, Bishkek, Kyrgyzstan;
²The first President of Russia B.N. Yeltsyn Kyrgyz Russian Slavic university, 720000, Bishkek, Kyrgyzstan;
³The Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The I.M. Sechenov First Moscow State Medical University" of Minzdrav of Russia, 119991, Moscow, Russia;
⁴The Research Institute of Molecular Biology and Medicine, 720040, Bishkek, Kyrgyzstan;
⁵The Center of Family Medicine №7, 720040, Bishkek, Kyrgyzstan;

⁶The Federal State Official Institution "The academician N.N. Burdenko Main Military Clinical Hospital" of Minoborona of Russia, 105229, Moscow, Russia;

⁷The Osh State University, 714000, Osh, Kyrgyzstan

To study and analyze the cardiorenal relationships in nephrotic syndrome, taking into account sex differences. A total of 272 patients with nephrotic syndrome (NS) aged 16 to 65 years were examined. All patients underwent general clinical examination, electro- and echocardiography, assessment of peripheral and biochemical blood counts. NS was determined with daily proteinuria of more than 3.5 g/1.73 m² per day, hypoalbuminemia (albumin less than 30 g/l) and hyperlipidemia (total cholesterol more than 5.1 mmol/l). The duration of the National Assembly ranged from 3 months or more. Depending on the gender, the total sample (n=272) was divided into two subgroups: the 1st subgroup - patients with female NS (n=88), the 2nd subgroup - males with NS (n=184). The mean systolic, diastolic, pulse and mean arterial pressure (BP) were significantly higher in male NS patients (p<0.05). Supraventricular and ventricular ectopic activity was significantly more common in males. In the subgroup of women with NA, sinus tachycardia was significantly more frequently detected, a slowing down of the impulse conduction along the bundle of His, a violation of the processes of repolarization of the LV (p<0.05). The final systolic and diastolic sizes of the left ventricle (LV), the thickness of the interventricular septum and the posterior wall of the left ventricle, the diameter of the aorta, the longitudinal size of the left atrium and the right ventricle were significantly larger in the group of males with NA. Significantly lower concentrations of hemoglobin, hematocrit, erythrocyte counts were observed in the subgroup of females with NS compared with men (p<0.05). In the cohort of men with HC, there was a significant decrease in the content of total serum protein (44.8±11.0 g/l versus 49.2±11.2 g/l; p=0.003) as compared with females. In the male subgroup of HC, serum creatinine concentration [97 (81;143) mmol/l versus 86 (68;123) mmol/l; p=0.005] and the degree of daily protein excretion [6,490 (4,865;9,661) g versus 5,585 (4,168;7,625) g; p=0.034] with urine were significantly higher compared with the female subgroup (Table 2). At the same time, in the cohort of men with HC, there was a significant decrease in the calculated GFR [62.3 (46.2; 114.9) ml/min versus 87.0 (67.7;127.5) ml/min; p=0.002]. In case of NS in females, factors of deterioration of cardiorenal interrelations are anemia, sinus tachycardia, slowing down of impulse conduction along the bundle of His. Whereas in the NA subgroup of men, negative factors of cardiorenal interrelations are hypoproteinemia, increased systolic, diastolic, pulse and mean blood pressure, creatinine concentration and daily proteinuria, which was accompanied by a decrease in glomerular filtration rate and an increase in the linear dimensions of the heart.

Key words: nephrotic syndrome; cardiorenal interrelations; risk factors; proteinuria; renin-angiotensin-aldosterone system; sex differences.

For citation: Murkamilov I.T., Sabirov I.S., Fomin V.V., Aitbaev K.A., Murkamilova Zh.A., Rayimjanov Z.R., Redjapova N.A., Yusupov F.A. Bilateral impact of cardiorenal relationships in the nephrotic syndrome. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (4): 196-203 (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-196-203>

For correspondence: Murkamilov I.T., nephrologist of first qualification category, candidate of medical sciences, assistant of the Chair of Faculty Therapy of the I.K. Akhunbaiev Kyrgyz State Medical Academy; e-mail: murkamilov.i@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.03.2019
Accepted 23.03.2019

Введение. Еще 1928 году основоположник советской нефрологии академик Е.М. Тареев в монографии «Анемия брайтиков» впервые применил термин «нефротический синдром» [1]. За эти годы вопросам этиологии, патогенеза и тактике лечения нефротического синдрома (НС) посвящены многие клинико-эпидемиологические [2,3-6] и медико-генетические исследования [7-9]; в результате разработаны международные и национальные рекомендации [10, 11-13]. НС наиболее часто наблюдают среди лиц с мембранозной нефропатией [11], фокально-сегментарным гломерулосклерозом [12], мембранозно-пролиферативным гломерулонефритом [14] и при болезни минимальных изменений [15]. В настоящее время НС рассматривают как сложный клинико-лабораторный комплекс, образовавшийся в результате поражения клубочкового аппарата почек [16]. В основе НС лежит протеинурия (потеря с мочой более 3,5 г/1,73м² в сутки или более 40 мг/м²/ч белка), гипоальбуминемия (альбумин менее 30 г/л), гиперлипидемия (общий холестерин более 5,1 ммоль/л). Присутствие отеков при НС (полный НС) прогностически более неблагоприятен и практически вынуждает больного обращаться за специализированной медицинской помощью в отличие от НС без отеков

(неполный НС) [16, 17]. Как отмечено, интегральным параметром НС служит протеинурия, наиболее вероятной причиной которого является изменение структуры подоцитов и базальной мембраны клубочков. В клинике внутренних болезней при НС особое внимание следует уделять сердечно-сосудистой системе [16]. Так как, при персистирующем НС довольно рано развиваются структурно-функциональные изменения и со стороны сердечнососудистой системы [16]. Очевидно, столь раннее поражение указанной системы объясняется отрицательным влиянием протеинурии, гипер- и дислипидемии на монослой эндотелия сосудов [17]. В последние годы установлено, что активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) наблюдают и при НС, особенно при гиповолемическом варианте [18]. Общеизвестно, исходом гиперактивации циркулирующей РААС является возникновение артериальной гипертензии (АГ). Как отмечено, при НС сдвиги метаболизма белков и липидов сопровождают изменения в свертывающей и противосвертывающей системах крови [16]. В частности, за счет выведения с мочой антитромбина III, а также в связи с активацией кинин-каликреиновой системы, уменьшается активность антикоагулянтных

и фибринолитических факторов [19]. Вместе с тем, при НС регистрируются гипофосфатемия и гипокальциемия в результате потери с мочой холекальциферолсвязывающего белка, что приводит к дефициту витамина D и развитию вторичного гиперпаратиреоза [20, 21]. Более ранние исследования показали, что при НС наблюдают снижение концентрации ионов цинка, кобальта, железа и содержания белка трансферина; объясняют это сопряженность НС с анемией [22, 23, 17]. У пациентов с НС значительно повышен риск прогрессирования атеросклероза и возникновения типичных атероматозных осложнений [16]. В популяции женщин сердечнососудистые заболевания (ССЗ) также являются главной причиной летальности, но факторы риска кардиоваскулярной патологии у мужчин и женщин существенно различаются [24].

Принимая во внимание изложенные данные, для клиницистов большое значение имеют выявление половых (гендерных) различий двусторонних кардиоренальных взаимоотношений при НС для предупреждения возникновения сердечнососудистых осложнений (ССО) и отдаления того периода заболевания, когда может потребоваться гемодиализ.

Цель исследования - оценить и проанализировать влияние обоюдных кардиоренальных нарушений при нефротическом синдроме с учетом половых различий.

Материал и методы. Обследованы 272 больных (88 женщин и 184 мужчин, средний возраст $36,2 \pm 12,8$ года) с НС длительностью от 3-х и более месяцев. Исследование одобрено этическим комитетом КГМА имени И.К. Ахунбаева, получено информированное согласие каждого из пациентов на исследование. Во всех случаях диагностирован НС, у 9 (3,3%) больных был вторичный вариант НС. В 107 (39,3%) случаях НС был в сочетании с АГ. У 9 (3,3%) лиц НС сопровождал эрозивный гастрит и в 12 (4,4%) – стабильная форма ишемической болезни сердца (ИБС). Наличие почечной недостаточности, т. е. снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) менее 60 мл/мин/1,73м², имело место у 56 (20,5%) обследованных лиц. СКФ рассчитывали, используя формулу СКД-EPi (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) [25]. Хроническую болезнь почек (ХБП) диагностировали согласно рекомендациям Научного общества нефрологов России (2012) [26]. Больные были разделены на две подгруппы: подгруппа женщины ($n=88$) и подгруппа мужчины ($n=184$). Критериями включения в исследование считали наличие НС, в качестве критерия исключения принимали во внимания случаи ненефротической протеинурии (потеря белка с мочой менее 3,5 г белка), врожденные и приобретенные пороки сердца, цирроз печени и беременность. Измерение артериального давления (АД), в том числе пульсового и среднего, веса и расчет индекса массы тела (ИМТ) проводили по общепринятой методике. Всем больным выполнено лабораторное обследование: оценка показателей периферической крови [концентрация гемоглобина (Hb), гематокрита (Ht), числа эритроцитов и тромбоцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH) и скорость

оседания эритроцитов (СОЭ)]. Из биохимических показателей в сыворотке крови оценивали содержание общего холестерина (ХС), ХС липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), ХС липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицериды (ТГ), С-реактивный белок, общий белок и альбумин, содержание ионов калия, кальция, натрия, мочевой кислоты и антистрептолизина-О (АСЛ-О). Дополнительно, у всех лиц с НС оценивали показатели фибриногена, протромбинового индекса (ПТИ), фибринолитическую активность и активированное время рекальцификации (АВР) плазмы крови. Дополнительно, всем больным выполняли электрокардиографию (ЭКГ) на 6 – канальном аппарате Cardiovit AC104PC (Shiller, Швейцария) в 12 стандартных отведениях с расшифровкой по общепринятому методу [27]. Эхокардиографическое (ЭхоКГ) исследование проводили на аппарате «Sequoia 512» корпорации «Siemens-Acuson» в (В) и (М) режимах по общепринятой методике. Определяли диаметр выходного тракта аорты, продольного размера левого предсердия (ЛП) и правого желудочка (ПЖ), показатели внутрисердечной гемодинамики – конечный систолический размер (КСР), конечный диастолический размер (КДР), фракцию выброса (ФВ) левого желудочка (ЛЖ). Оценивали толщину межжелудочковой перегородки (ТМЖП), толщину задней стенки ЛЖ (ТЗСЛЖ) и передней стенки ПЖ в диастолу [28]. Все данные, полученные в исследовании, обработаны с помощью программного обеспечения Statistica for Windows 10.0.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica версии 6.0. Для получения количественных данных рассчитывали описательные статистические показатели: абсолютное и относительное (процент) число пациентов, медиана 25% и 75% квартили [Me, (25%; 75%)]. Значимость различий между группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента (для переменных с нормальным распределением) и теста Манна-Уитни (для переменных с непараметрическим распределением). Данные представлены, как среднее \pm стандартное отклонение для переменных с нормальным распределением, медиана (25%; 75%) для переменных с непараметрическим распределением. Уровнем статистической достоверности считается значение $p < 0,05$ [29].

Результаты. Настоящее исследование включает анализ данных 272 больных с НС. Сравнительный межгрупповой анализ показал (табл.1), что исходно представленная выборка была схожим по возрасту, ИМТ и ЧСС. Средние уровни систолического, диастолического, пульсового и среднего АД, достоверно выше у больных НС мужского пола ($p < 0,05$). В этой же группе на ЭКГ существенно чаще регистрировали наджелудочковую и желудочковую эктопическую активность. По сравнению с мужчинами, в группе женщин с НС синусовая тахикардия, замедление проведения импульса по ножкам пучка Гиса и нарушение процессов реполяризации ЛЖ выявляли достоверно чаще ($p < 0,05$). Наличие миграции водителя ритма сердца отметили у двоих мужчин (табл.1); этого не отмечалось в подгруппе женщин. Далее приведены

Сравнительные клинико-инструментальные показатели обследованных групп

Показатели	Женщины (n=88)	Мужчины (n=184)	p
Возраст, годы	37,1±11,9	36,5±13,2	0,739
Индекс массы тела, кг/м ²	27,4±5,8	26,4±6,6	0,236
Число сердечных сокращений, уд/мин	79±11	77±9	0,113
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	126±24	135±23	0,003
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	82±13	86±12	0,027
Пульсовое артериальное давление, мм рт. ст.	44±15	50±16	0,008
Среднее артериальное давление, мм рт. ст.	42±8	45±7	0,003
Синусовая тахикардия, n (%)	14 (15,9)	6 (3,2)	0,013
Синусовая брадикардия, n (%)	2 (2,2)	4 (2,1)	0,100
Блокады ножек пучка Гиса, n (%)	9 (10,2)	11 (5,9)	0,000
Нарушение процессов реполяризации миокарда, n (%)	15 (17,0)	16 (8,6)	0,000
Нарушение возбудимости миокарда, n (%)	2 (2,2)	13 (7,0)	0,000
Миграция водителя ритма сердца, n (%)	-	2 (1,0)	-
Диаметр аорты (восходящий отдел), см	2,93±0,34	3,31±0,36	0,000
Продольный размер левого предсердия, см	3,16±0,39	3,39±0,42	0,000
Конечный диастолический размер левого желудочка, см	4,76±0,42	5,14±0,44	0,000
Конечный систолический размер левого желудочка, см	3,03±0,41	3,31±0,38	0,000
Толщина межжелудочковой перегородки, см	0,83±0,11	0,93±0,11	0,000
Толщина задней стенки левого желудочка, см	0,82±0,10	0,92±0,12	0,000
Фракция выброса левого желудочка, %	65,3±3,75	64,6±4,67	0,206
Продольный размер правого желудочка, см	1,79±0,33	1,96±0,34	0,000
Толщина передней стенки правого желудочка, см	0,37±0,04	0,39±0,05	0,054

Примечание. n – число пациентов; p – достоверность.

результаты сравнительной оценки параметров ЭхоКГ. Стоит отметить, за исключением ФВ ЛЖ и толщины передней стенки ЛЖ, все исследуемые индексы ЛЖ (КСР, КДР, ТМЖП и ТЗСЛЖ) и диаметр аорты, продольный размер ЛП и ПЖ существенно больше в группе лиц мужского пола с НС (табл. 1).

Обследуемая нами выборка женщин и мужчин по показателям периферической крови не были схожими (табл. 2). Так, статистически значимое снижение содержания Нв, Нт, числа эритроцитов и показателя МСН отмечено в подгруппе лиц женского пола с НС, по сравнению с мужчинами ($p < 0,05$). Количество тромбоцитов периферической крови между группами различались не достоверно ($p > 0,05$). Медиана и межквартильный размах показателя СОЭ в исследуемой когорте не достигало статистически значимого порога ($p = 0,050$). Доля женщин и мужчин с НС и повышенным содержанием АСЛ-О в биохимическом анализе крови были схожими (табл. 2). Концентрация общего ХС, ХС ЛПВП, ХС ЛПНП, ТГ, электролитов, мочевой кислоты и альбумина сыворотки крови между группами существенного различия не выявили. Однако, у мужчин с НС наблюдали существенное снижение содержание общего белка сыворотки крови ($44,8 \pm 11,0$ г/л против $49,2 \pm 11,2$ г/л; $p = 0,003$), по сравнению с лицами женского пола. Соотношение боль-

ных с повышенным содержанием С-реактивного белка крови были идентичными (табл. 2). В оцениваемых нами подгруппах статистически значимая разница в показателях свертывающей и противосвертывающей системах крови (фибриноген, ПТИ, фибринолитическая активность и АВР) не выявлена. Необходимо подчеркнуть, что величина СКФ как у женщин, так и у мужчин с НС была схожей. Однако, в подгруппе мужчин НС концентрация креатинина сыворотки крови [97 ($81; 143$) мкмоль/л против 86 ($68; 123$) мкмоль/л; $p = 0,005$] и степени суточной экскреции белка [$6,490$ ($4,865; 9,661$) г/сутки против $5,585$ ($4,168; 7,625$) г/сутки; $p = 0,034$] с мочой было достоверно выше, по сравнению с подгруппой женского пола (табл. 2). Одновременно, в когорте мужчин с НС отмечено существенное снижение расчетной СКФ [$62,3$ ($46,2; 114,9$) мл/мин против $87,0$ ($67,7; 127,5$) мл/мин; $p = 0,002$].

Обсуждение. В настоящее время неоспоримым является тот факт, что больные с ХБП входят в категории высокого и очень высокого дополнительного нефрокардио- и церебрального риска [26.30]. Весьма важным механизмом, который следует иметь в виду, в отношении оценки кардиоренального взаимоотношения, являются неиммунные факторы прогрессирования ХБП, в том числе и при НС. В частности, своевременная коррекция нефрогенной гиперлипидемии,

Сравнительная лабораторная характеристика обследованных групп

Показатели	Женщины (n=88)	Мужчины (n=184)	P
Гемоглобин, г/л	127±20	140±23	0,000
Гематокрит, %	38,1±6,1	42,0±6,8	0,000
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	4,30±0,47	4,57±0,54	0,000
МСН, пг	29,3±2,07	30,5±1,91	0,000
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	251,6±35,5	248,9±35,4	0,653
Скорость оседания эритроцитов, мм/час	25 (15;40)	22 (10;35)	0,050
Антистрептолизин-О, п (%)	22 (25,0)	54 (29,3)	0,490
Общий холестерин, ммоль/л	7,89±2,88	8,12±3,19	0,578
Холестерин ЛПВП, ммоль/л	1,29±0,44	1,18±0,51	0,162
Холестерин ЛПНП, ммоль/л	4,65 (3,52;6,60)	5,10 (3,68;8,07)	0,229
Триглицериды, ммоль/л	2,23 (1,80;2,91)	2,53 (1,58;3,69)	0,329
Натрий, ммоль/л	137,7±5,0	138,8±5,6	0,214
Кальций, ммоль/л	1,30±0,46	1,33±0,45	0,771
Калий, ммоль/л	4,41±0,62	4,51±0,78	0,193
Мочевая кислота, ммоль/л	0,33±0,10	0,36±0,10	0,064
Альбумин, г/л	23,5±9,5	23,4±9,6	0,928
Общий белок, г/л	49,2±11,2	44,8±11,0	0,003
С-реактивный белок, п (%)	13 (14,7)	47 (25,5)	0,061
Фибриноген, г/л	6,437 (5,550;8,880)	6,771 (5,106;9,990)	0,538
Протромбиновый индекс, %	89,7±11,0	88,1±11,8	0,324
Фибринолитическая активность,	175 (160;180)	170 (148;184)	0,209
Активированное время рекальцификации, сек	57,5 (50;65)	59 (51;65)	0,576
Креатинин, мкмоль/л	86 (68;123)	97 (81;143)	0,005
Расчетная СКФ, мл/мин	87,0 (67,7;127,5)	62,3 (46,2;114,9)	0,002
Протеинурия, г/сутки	5,585 (4,168;7,625)	6,490 (4,865;9,661)	0,034

Примечание. n – число пациентов; p – достоверность; МСН – среднее содержание гемоглобина в эритроците; СКФ – скорость клубочковой фильтрации.

анемии и АГ замедляет темпы прогрессирования ХБП и связанные с ним ССО [26,30]. С. Ronco et al. (2008) выделяет 5 типов кардиоренального синдрома (КРС) [32]. С позиции кардиоренальных взаимоотношений обследованные нами больные составляли 4 типа КРС, т.е. хроническая дисфункция почек приводит к поражению сердечно-сосудистой системы [32]. В ранее проведенном исследовании показано, что увеличение внеклеточной жидкости на начальной стадии ХБП способствует развитию ССО [33]. Известно, что тяжесть НС зависит от степени суточной экскреции белка с мочой и содержанием общего белка в сыворотке крови. Так, среди обследованных нами больных с НС мужского пола, отмечено более выраженное снижение общего белка крови и ее суточная экскреция с мочой (табл. 2). Здесь уместно отметить, что в настоящее время в норме экскреция белка с мочой у взрослых составляет не более 50 мг/сут и альбумина – 10 мг/сут. Столь жесткое ограничение было обусловлено прогностическими значениями альбумин/протеинурии в отношении развития ССО [29]. Самостоятельная роль альбуминурии в отношении сердечно-сосудистого риска у лиц женского пола постменопаузе показаны в работе Н.И. Ахн и соавт. [34]. Влияние альбумин/протеинурии на сосудистую стенку микроциркуляции клубочков отмечено в ранее проведенном исследовании [34].

Центральным звеном патогенеза кардиоренальных взаимоотношений при НС является гиперактивация РААС [32, 35]. Так как, длительное существование НС приводит к увеличению системного АД в результате чрезмерной активации циркулирующей РААС [36]. Активация тканевой РААС вызывает торможение СКФ [36]. Установлено, что с возрастом наблюдается замедление СКФ на 1 мл/мин каждый год [37]. Исследования доказали четкую связь между степенью повышения АД, длительностью его существования и частотой развития ХБП [38,39]. В отдельных работах установлено, что активность ангиотензин-превращающего фермента у лиц мужского пола повышается и снижается у лиц женского пола с возрастом после полового созревания [40]. Так, повышение систолического АД на 15 мм рт.ст. увеличивает риск ССО у женщин на 52%, у мужчин – на 34% [41]. Показано, что заболеваемость и распространенность ССЗ и АГ существенно выше у мужчин, чем в сопоставимых по возрасту когортах женщин репродуктивного возраста [42]. В ряде клинических исследований выдвигали положение о том, что у мужчин активность показателей РААС выше по сравнению с женщинами репродуктивного возраста [42, 43]. Половые особенности кардиоренальных взаимоотношений у больных с ХБП и самостоятельная роль ренальной дисфункции в стратификации кардио- и нефроцеребрального

риска изложены в ранее опубликованных нами работах [44–47].

Более низкая активность РААС у женщин в период менопаузы ассоциируется с более низким уровнем АД, по сравнению с мужчинами [48, 49]. К тому же, повышение активности РААС у лиц мужского пола при АГ способствует более ускоренному тканевому повреждению. Если принимать во внимание, что на долю тканевого РААС приходится 90%, то патофизиологические сдвиги в почках и миокарда идут гораздо быстрее. Таким образом, развиваются нарушения возбудимости и проводимости сердца, расширение его полостей с последующим глобальным снижением функции ЛЖ, наслоение которого при НС дополнительно приводит к ухудшению азотовыделительной функции почек. Это факт находит подтверждение и в нашем исследовании, где в подгруппе мужчин с НС регистрировали подъем концентрации креатинина сыворотки крови и снижение СКФ (табл. 2) с одной стороны и достоверное увеличение линейных размеров сердца, с другой (см. табл. 1). Сочетание АГ и сниженного уровня СКФ увеличивает вероятность развития анемии при НС. Так, полученная разница в показателях красной крови у лиц женского пола с НС, на наш взгляд, связана также с репродуктивным возрастом. К тому же, определение содержания железа сыворотки крови у обследованных нами больных проводили не всем, в связи с этим в настоящем исследовании показатель железа сыворотки приведен не был. Анемия - как фактор риска прогрессирования ХБП и ССО исследован в серии клинико-эпидемиологических работ [50–52]. В условиях анемии внутрипочечная продукция ангиотензина II несколько раз выше, а последующие анемическая (гипоксическая) вазодилатация и повышение ЧСС вносят вклад в возникновении кардиоренальных взаимоотношений [53, 54]. Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют, что при НС имеются весомые факторы риска кардиоренальных нарушений. При НС у лиц женского пола факторами развития КРС является анемия, синусовая тахикардия, замедление проведения импульса по ножкам пучка Гиса. У мужчин НС факторами развития КРС 4 типа служат гипопропротеинемия, повышение систолического, диастолического, пульсового и среднего АД, концентрации креатинина и величины суточной протеинурии, что сопровождалось снижением СКФ и увеличением линейных размеров сердца.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5–10, 22, 23, 25, 30, 32–43, 48, 49, 52, см. REFERENCES)

1. Мухин Н.А. Первая монография Е.М. Тареева «Анемия брайтиков» и нефрология XXI века. *Терапевтический архив*. 2005; 6: 5-10.
2. Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Нанчикеева М.Л., Чеботарёва Н.В., Ли О.А. Ремоделирования почек и сердца при хронической болезни почек - мишень нефрокардиопротекции. *Артериальная гипертензия*. 2014; 20 (6): 492-500.
3. Козловская Л.В., Бобкова И.Н., Плиева О.К., Чеботарёва Н.В., Щербак А.В., Мухин Н. А. Значение исследования в моче молекулярных медиаторов иммунного воспаления и фиброза в почке при хроническом гломерулонефрите. *Терапевтический архив*. 2004;9: 84-7.
4. Мухин Н.А., Козловская Л.В., Бобкова И.Н., Плиева О.К., Чеботарёва Н.В., Щербак А.В. Индуцируемые протеинурией механизмы ремоделирования тубулоинтерстиция и возможности нефропротекции при гломерулонефрите. *Вестник РАМН*. 2005; 1: 3-8.
11. Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Цыгин А.Н., Шилов Е.М. Клинические рекомендации по диагностике и лечению мембранозной нефропатии. *Нефрология*. 2014;18(4): 93-100.
12. Бобкова И.Н., Козловская Л.В., Цыгин А.Н., Шилов Е.М. Клинические рекомендации по диагностике и лечению фокально-сегментарного гломерулосклероза. *Нефрология*. 2015; 19(1):78-85.
13. Шилов Е.М., Бобкова И.Н., Колина И.Б., Камышова Е.С. Клинические рекомендации по диагностике и лечению IgA-нефропатии. *Нефрология*. 2015;19(6):83-92.
14. Кодра С., Барбуллуши М., Короши А., & Тасе М. Мембранозно-пролиферативный гломерулонефрит (клинико-биологические особенности и характер прогрессирования по данным наблюдения 40 больных). *Нефрология*. 1998; 2: 63-7. (in Russian)
15. Смирнов А.В., Трофименко И.И., Сиповский В.Г. Болезнь минимальных изменений у взрослых. *Нефрология*. 2013;17(6): 9-36.
16. Тареева И.Е., ред. *Нефрология. Руководство для врачей*. М.: Медицина; 2000.
17. Мухин Н.А. *Нефрология. Национальное руководство. Краткое издание*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018.
18. Шилов Е.М. *Нефрология*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008.
19. Панютина Я. В., Папаян К. А., Савенкова Н. Д. Нарушения системы гемостаза при нефротическом синдроме у детей. *Нефрология*. 2004;8: 4: 32-40.
20. Волгина Г.В., Перепеченных Ю.В. Паратиреоидный гормон-универсальный уремический токсин. *Нефрология и диализ*. 2000; 2: 1-2: 32-8.
21. Ермоленко В.М., Волгина Г.В., Добронравов В.А., Рожинская Л.Я., Смирнов А.В., Томилина Н.А. и др. Национальные рекомендации по минеральному и костным нарушениям при хронической болезни почек. *Нефрология и диализ*. 2011; 13:1: 33-51.
24. Кузнецова И.В., Мычка В.Б., Войченко Н.А., Кириллова М.Ю., Оганов Р.Г. Кардиометаболический риск у женщин в пери- и постменопаузе. *Consilium medicum*. 2012; 6: 5-11.
26. Моисеев В.С., Мухин Н.А., Смирнов А.В., Кобалава Ж.Д., Бобкова И.Н., Виллевалде С.В. и др. Сердечно-сосудистый риск и хроническая болезнь почек: стратегии кардио-нефропротекции. *Российский кардиологический журнал*. 2014;(8): 7-37.
27. Орлов В.Н. *Руководство по электрокардиографии*. 7-е издание. М.: МИА; 2012.
28. Флаксампф Франк А. *Практическая эхокардиография*. М.; 2013.
29. Орлов А.И. *Прикладная статистика*. М.; 2006.
31. Игнатова М.С., Длин В.В. Нефротический синдром: прошлое, настоящее и будущее. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2017; 62 (6): 29–44.
44. Муркамилов И.Т., Айтбаев К.А., Фомин В.В. Половые особенности сердечно-сосудистых осложнений у больных хроническим гломерулонефритом на преддиализной стадии заболевания. *Терапевтический архив*. 2017;89: 6: 56-61.
45. Иманов Б.Ж., Муркамилов И.Т., Сабиров И.С., Сарыбаев А.Ш. Влияние почечной дисфункции на сердечно-сосудистую систему: возможности ранней диагностики почечной дисфункции. *Архив внутренней медицины*. 2018;8(4):260-5.
46. Муркамилов И.Т., Сабиров И.С., Муркамилова Ж.А., Фомин В.В., Сабирова А.И., Айтбаев К.А. Стратификация нефроцеребрального и сердечно-сосудистого риска при хронических гломерулонефритах (обзор литературы). *Архив внутренней медицины*. 2018; 8(6): 418-23.
47. Муркамилов И.Т., Айтбаев К.А., Сабиров И.С., Райимжанов З.Р., Реджапова Н.А., Юсупов Ф.А. и др. Хроническая болезнь почек и цереброваскулярная патология. *Дневник казанской медицинской школы*. 2017;3:17: 76-80.

50. Шило В.Ю., Денисов А.Ю. Лечение нефрогенной анемии: вчера, сегодня, завтра. *Клиническая нефрология*. 2011; 3: 36-42.
51. Муркамилов И.Т. Анемия как фактор риска прогрессирования сердечно-сосудистых осложнений при хронических болезнях почек. *Сибирский медицинский журнал*. 2011; 104 (5): 11-5.
54. Маковеева О.В., Гордиенко А.В., Дыдышко В.Т., Мирохина М.А., Тишко В.В., Яковлев В.В. и др. Стратификация кардиоваскулярного риска у лиц молодого возраста, страдающих эссенциальной гипертензией. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2014; 4(48): 58-61.

REFERENCES

1. Mukhin N.A. The first monograph by E.M. Tareeva "Anemia of bratikov" and nephrology of the XXI century. *Therapevticheskiy arkhiv*. 2005; 6: 5-10. (in Russian)
2. Bobkova I.N., Kozlovskaya L.V., Nanchikeeva M.L., Chebotareva N.V., Li A.O. Molecular and cellular mechanisms and mediator system of kidney and heart remodeling in chronic kidney disease - the target of nephro- and cardioprotection. *Arterial'naya gipertenziya*. 2014; 20(6): 492-500. (in Russian)
3. Kozlovskaya L.V., Bobkova I.N., Plieva O.K., Chebotareva N.V., Scherbak A.V., Muckhin N.A. Significance of research in urine of molecular mediators of renal immune inflammation and fibrosis in chronic glomerulonephritis. *Therapevticheskiy arkhiv*. 2004; 9: 84-7. (in Russian)
4. Mukhin N.A., Kozlovskaya L.V., Bobkova I.N., Plieva O.K., Chebotareva N.V., Scherbak A.V. Renal tubulointerstitium remodeling induced by proteinuria and nephroprotection in chronic glomerulonephritis. *Vestnik RAMN*. 2005;1: 3-8. (in Russian)
5. Eddy A.A., Symons J.M. Nephrotic syndrome in childhood. *The Lancet*. 2003;362:9384: 629-39.
6. Zech P., Colon S., Pointet P.H., Deteix P., Labeeuw M., & Leitiene P.H. The nephrotic syndrome in adults aged over 60: etiology, evolution and treatment of 76 cases. *Clinical nephrology*. 1982; 17 (5):232-6.
7. Shin J. I., Kronbichler A., Oh J., & Meijers B. Nephrotic Syndrome: Genetics, Mechanism, and Therapies. *BioMed research international*. 2018. DOI:<https://doi.org/10.1155/2018/6215946>.
8. Sen E.S., Dean P., Yarram-Smith L., Bierzynska A., Woodward G., Buxton C. et al. Clinical genetic testing using a custom-designed steroid-resistant nephrotic syndrome gene panel: analysis and recommendations. *Journal of medical genetics*. 2017;jmedgenet-2017-104811. DOI:<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104811>.
9. Machuca E., Benoit G., Antignac C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Human molecular genetics*. 2009;18:R2:R185-R194.
10. Lombel R.M., Gipson D.S., Hodson E. M. Treatment of steroid-sensitive nephrotic syndrome: new guidelines from KDIGO. *Pediatric nephrology*. 2013;28:3: 415-26.
11. Bobkova I.N., Kozlovskaya L.V., Cygin A.N., Shilov E.M. Clinical practice guidelines for diagnosis and treatment membranous nephropathy. *Nephrologiya (St.Petersburg)*. 2014;18(4): 93-100. (in Russian)
12. Bobkova I.N., Kozlovskaya L.V., Tsygin A.N., Shilov E.M. Clinical practice guideline for diagnostics and treatment of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrologiya (St.Petersburg)*. 2015;19(1): 78-85. (in Russian)
13. Shilov E.M., Bobkova I.N., Kolina I.B., Kamishova E.S. Clinical recommendations for diagnostics and treatment of iga-nephropathy. *Nephrology (St.Petersburg)*. 2015;19(6):83-92. (in Russian)
14. Kodra S., Barbullushi M., Koroshi A., & Tase M. Membranoproliferative glomerulonephritis (clinico-biological features and type of its progression by the data of 40 cases). *Nephrologiya*. 1998; 2: 63-7. (in Russian)
15. Smirnov A.V., Trofimenko I.I., Sipovskiy V.G. Minimal change disease in adults. *Nephrologiya (St.Petersburg)*. 2013;17(6): 9-36. (in Russian)
16. Tareeva I.E., ed. Nephrology. A guide for doctors [Nefrologiya. Rukovodstvo dlya vrachey]. Moscow: Meditsina; 2000. (in Russian)
17. Mukhin N.A. Nephrology. National leadership. Brief edition [Nefrologiya. Natsional'noe rukovodstvo]. Moscow: GEOTAR-Media; 2018. (in Russian)
18. Shilov E.M. Nephrology [Nefrologiya]. Moscow: GEOTAR-Media. 2008. (in Russian)
19. Panyutina Y.V., Papayan K.A., Savenkova N.D. Disturbances of the hemostasis system in children with nephrotic syndrome. *Nephrology (St.Petersburg)*. 2004; 8(4): 32-40. (in Russian)
20. Volgina G.V., Perepechennykh Yu.V. Parathyroid hormone is a universal uremic toxin. *Nephrologiya i dializ*. 2000; 2:1-2:32-8. (in Russian)
21. Ermolenko V.M., Volgina G.V., Dobronravov V.A., Rozhinskaya L.Ya., Smirnov A.V., Tomilina N.A. National recommendations for mineral and bone disorders in chronic kidney disease. *Nephrologiya i dializ*. 2011;13(1): 33-51. (in Russian)
22. Bush J.A. The role of trace elements in hemopoiesis and in the therapy of anemia. *Pediatrics*. 1956;17 (4): 586-95.
23. Sederholm T., Kouvalainen K., Lamberg B. A. Cobalt-induced hypothyroidism and polycythemia in lipid nephrosis. *Acta Medica Scandinavica*. 1968;184(1-6): 301-6.
24. Kuznetsova I.V., Mychka V.B., Voichenko N.A., Kirillova M.Yu., Oganov R.G. Cardiometabolic risk in peri- and postmenopausal women. *Consilium medicum*. 2012;6: 5-11.(in Russian)
25. Levey A.S., Stevens L.A. Estimating GFR using the CKD epidemiology collaboration (CKD-EPI) creatinine equation: more accurate GFR estimates, lower CKD prevalence estimates, and better risk predictions. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*. 2010;55:4:622-7.
26. Moiseev V.C., Mukhin N.A., Smirnov A.V., Kobalava J.D., Bobkova I.N., Villevalde S.V. et al. Cardiovascular risk and chronic kidney disease: cardio-nephroprotection strategies. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2014;(8): 7-37. (in Russian)
27. Orlov V.N. Guide to electrocardiography. 7th edition. Moscow: MIA; 2012. (in Russian)
28. Flakskampf Frank A. Practical echocardiography; 2013.
29. Orlov A.I. Application statistics [Prikladnaya statistika]. Moscow; 2006. (in Russian)
30. Sarnak M.J., Levey A.S., Schoolwerth A.C., Coresh J., Culleton B., Hamm L.L. et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2003;108 (17): 2154-69.
31. Ignatova M.S., Dlin V.V. Nephrotic syndrome: past, present and future. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2017; 62:(6): 29-44. (in Russian)
32. Ronco C., Haapio M., House A.A., Anavekar N., & Bellomo R. Cardiorespiratory syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008; 52:19: 1527-39.
33. Meltzer J.I., Keim H.J., Laragh J.H., Sealey J.E., Jan K.M., & Chien S. Nephrotic syndrome: vasoconstriction and hypervolemic types indicated by renin-sodium profiling. *Annals of internal medicine*. 1979;91(5): 688-96.
34. Ahn H.J., Moon D.S., Kang D.Y., Lee J.I., Kim D.Y., Kim J.H. et al. Urinary albumin excretion reflects cardiovascular risk in postmenopausal women without diabetes: the 2011 to 2013 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Endocrinology and Metabolism*. 2016;31:4:537-46.
35. Stehouwer C.D., Smulders Y.M. Microalbuminuria and risk for cardiovascular disease: analysis of potential mechanisms. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2006; 17:2106-11.
36. Kearney M., ed. Chronic Heart Failure. Oxford University Press: USA; 2008.
37. Hammond T.G., Whitworth J.A., Saines D., Thatcher R., Andrews J., & Kincaid-Smith P. Renin-angiotensin-aldosterone system in nephrotic syndrome. *American Journal of Kidney Diseases*. 1984;4:1:18-23.
38. Sharma A. Renal involvement in hypertensive cardiovascular disease. *European Heart Journal*. 2003;5:Suppl. F:F12-8.
39. Sarnak M., Levey A. Cardiovascular disease and chronic renal disease: a new paradigm. *Am. J. Kidney Dis*. 2000; 35(4): Suppl.1: S17-31.
40. Delanaye P., Schaeffner E., Ebert N., Cavalier E., Mariat C., Krzesinski J. M. et al. Normal reference values for glomerular filtration rate: what do we really know? *Nephrol. Dial. Transplant*. 2012; 27(7): 2664-72.
41. De Backer G., Ambrosioni E., Borch-Johnsen K., Brotons C., Cifkova R., Dallongeville J. et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *European heart journal*. 2003; 24:17: 1601-10..

42. Reckelhoff J.F. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension*. 2001; 37:5: 1199–1208.
43. Komukai K., Mochizuki S., Yoshimura M. Gender and the renin–angiotensin–aldosterone system. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2010; 24 (6): 687–98.
44. Murkamilov I.T., Aitbaev K.A., Fomin V.V. Gender features of cardiovascular events in patients with chronic glomerulonephritis at the pre-dialysis stage of the disease. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2017; 89:6: 56–61. (in Russian)
45. Imanov B.Z., Murkamilov I.T., Sabirov I.S., Sarybaev A.S. Effect of renal dysfunction on the cardiovascular system. the possibilities of early diagnosis of the renal dysfunction. *Arkhiv vnutrenney meditsiny*. 2018; 8(4): 260–5. (in Russian)
46. Murkamilov I.T., Sabirov I.S., Murkamilova Z.A., Fomin V.V., Sabirova A.I., Aitbaev K.A. et al. Stratification of nephrocerebral and cardiovascular risk in chronic glomerulonephritis (literature review). *Arkhiv vnutrenney meditsiny*. 2018; 8(6): 418–23. (in Russian)
47. Murkamilov I.T., Aitbaev K.A., Sabirov I.S., Rayimzhanov Z.R., Redzhapova N.A., Yusupov F.A. Chronic kidney disease and cerebrovascular disease. *Dnevnik Kazanskoy meditsinskoy shkoly*. 2017; 3:17:76–80. (in Russian)
48. Engeli S., Bohnke J., Gorzelniak K., Janke J., Schling P., Bader M. et al. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension*. 2005; 45 (3): 356–62.
49. Fishbane S., Spinowitz B. Update on anemia in ESRD and earlier stages of CKD: core curriculum 2018. *American Journal of Kidney Diseases*. 2018;71:3:423–435. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2017.09.026>.
50. Shylo V.Yu., Denisov A.Yu. Treatment of nephrogenic anemia: yesterday, today, tomorrow. *Clinical Nephrology*. 2011;3:36–42.
51. Murkamilov I.T. Anemia as a risk factor for the progression of cardiovascular complications in chronic kidney disease. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2011;104:5:11–5. (in Russian)
52. Cole J., Ertoy D., Lin H., Sutliff R. L., Egan E., Guyene T.T. et al. Lack of angiotensin II–facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme–deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106: 11:1391–8.
53. Schiffl H., Lang S. M. Angiotensin-converting enzyme inhibitors but not angiotensin II AT 1 receptor antagonists affect erythropoiesis in patients with anemia of end-stage renal disease. *Nephron*. 1999; 81(1):106–8.
54. Makoveeva O.V., Gordienko A.V., Dydyshko V.T., Mirokhina M.A., Tishko V.V., Yakovlev V.V. et al. Stratification of cardiovascular risk in young adults with essential hypertension. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2014; 48 (4): 58–61. (in Russian)

Поступила 01.03.19

Принята к печати 23.03.19

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЛИПИДОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Омский государственный педагогический университет, 644043, Омск, Россия

Предложена модификация метода Фолча для количественного определения содержания липидов в биологическом материале; после экстракции липидов смесью хлороформ/этанол проводят определение липидов с использованием ИК спектроскопии. В качестве аналитических полос поглощения выбраны полосы, которые соответствуют валентным и деформационным колебаниям метильных и метиленовых групп липидов и жирных кислот: 1396, 1458, 2853 и 2923 см⁻¹. Данные полосы не пересекаются с полосами поглощения белков и нуклеиновых кислот; это позволяет избежать стадии предварительной очистки липидов от нелипидных компонентов. Построена модель многофакторной регрессии, которая позволяет описывать экспериментальные данные с погрешностью, не превышающей 12%.

Ключевые слова: липиды; экстракция; метод Фолча; ИК спектроскопия; диагностика.

Для цитирования: Бельская Л.В., Сарф Е.А., Соломатин Д.В. Количественное определение содержания липидов в биологическом материале методом инфракрасной спектроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (4): 204-209. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-204-209>

Bel'skaya L.V., Sarf E.A., Solomatina D.V.

DETERMINATION OF THE QUANTITATIVE CONTENT OF LIPIDS IN A BIOLOGICAL MATERIAL BY THE METHOD OF IR SPECTROSCOPY

Omsk State Pedagogical University, Omsk, 644043, Russian Federation

A modification of the Folch method has been proposed for the quantitative determination of lipids in biological material, in which, after extraction of lipids with a chloroform / ethanol mixture, lipids are determined using IR spectroscopy. The bands corresponding to the stretching and deformation vibrations of the methyl and methylene groups of lipids and fatty acids were selected as analytical absorption bands: 1396, 1458, 2853, and 2923 cm⁻¹. These bands do not intersect with the absorption bands of proteins and nucleic acids, thus avoiding the stage of preliminary cleaning of lipids from non-lipid impurities. A multifactor regression model was constructed, which allows experimental data to be described with an error not exceeding 12%.

Keywords: lipids; extraction; Falch method; IR spectroscopy; diagnostics.

For citation: Bel'skaya L.V., Sarf E.A., Solomatina D.V. Determination of the quantitative content of lipids in a biological material by the method of IR spectroscopy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (4): 204-209 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-204-209>

For correspondence: Bel'skaya L.V., PhD in Chemistry, Associate Professor; e-mail: ludab2005@mail.ru

Information about authors:

Bel'skaya L.V., <http://orcid.org/0000-0002-6147-4854>

Sarf E.A., <http://orcid.org/0000-0003-4918-6937>

Solomatina D.V., <http://orcid.org/0000-0002-9356-9890>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 19.01.2019
Accepted 22.03.2019

В настоящее время не вызывает сомнений необходимость своевременной лабораторной диагностики нарушений метаболизма липидов (дислипидемий) и заболеваний, которые вызваны нарушениями метаболизма липидов [1]. Модификации, повышение точности определения липидов в большинстве методов достигают с помощью процедуры предварительной экстракции и получения прозрачных растворов липидов для их последующей ферментативной оценки [2, 3]. Поскольку липиды – это класс органических веществ, выраженно гетерогенных по химической

структуре, следует различать нейтральные липиды (неэтерифицированные жирные кислоты и их эфиры, моно-, ди- и триглицерины, стероиды, воски) и полярные липиды (глицерофосфолипиды, сфинго- и гликолипиды, цереброзиды). При экстракции приходится учитывать способность липидов не только к гидрофобным взаимодействиям, но и к образованию водородных, электростатических и ковалентных связей (сложноэфирных, амидных, гликозидных). Неполярные растворители (хлороформ, бензол, диэтиловый эфир) могут разрушать комплексы, образованные гидрофобными взаимодействиями в жировых клетках, тканях, в хиломикронах, в комплексах альбумина с неэтерифицированными жирными кислотами. Одно-

Для корреспонденции: Бельская Людмила Владимировна, канд. хим. наук; e-mail: ludab2005@mail.ru

Уравнения регрессии для отдельных ПП в ИК спектрах липидов

ПП, см ⁻¹	Высота пика		Площадь пика	
	Уравнение регрессии	R ²	Уравнение регрессии	R ²
1396	$y(A_{1396})=0,0092x-0,3729$	0,9965	$y(B_{1396})=0,0478x-1,042$	0,9878
1458	$y(A_{1458})=0,0188x+1,046$	0,9835	$y(B_{1458})=0,0933x+3,923$	0,9865
2853	$y(A_{2853})=4,33\ln(x)-13,71$	0,9413	$y(B_{2853})=91,24\ln(x)-305,0$	0,9663
2923	$y(A_{2923})=6,58\ln(x)-20,01$	0,9039	$y(B_{2923})=160,43\ln(x)-495,1$	0,9016
2957	$y(A_{2957})=0,0029x+1,6528$	0,7918	$y(B_{2957})=0,0121x+30,292$	0,1972

Примечание. y – высота/площадь пика, x – концентрация компонента, мкмоль.

временно полярные растворители (этанол, метанол) разрушают водородные и электростатические связи. Липиды, которые находятся в составе комплексов, образованных ковалентными связями, растворители не экстрагируют [4].

Наиболее распространенным методом экстракции липидов является метод Фолча [5, 6]; это смесь хлороформ – метанол (2:1) из расчета 20 объемов экстрагирующей смеси на одну часть биологического материала. Метод позволяет выделить 90–95% всех липидов из биологических жидкостей, из клеток и тканей. Спирт является необходимым компонентом всех смесей, которые используют при экстракции липидов; спирты разрушают комплексы липидов с белками, растворяют липиды и инактивируют ферменты, которые активируют гидролиз липидов [2]. Недостатком метода является то, что смеси растворителей, которые содержат спирт, экстрагируют также нелипидные вещества (сахара, аминокислоты, соли и т.д.). Для удаления нелипидных примесей экстракт липидов необходимо промывать водой или слабыми солевыми растворами. Однако это приводит к частичной потере кислых липидов, а также, в некоторых случаях, способствует образованию стабильных эмульсий. Очистить липиды от нелипидных примесей можно, пропуская экстракты через колонки, заполненные целлюлозой или сефадексом, используя процедуру диализа через специальные мембраны.

Очистки от нелипидных компонентов (примесей) можно избежать, если использовать метод инфракрасной (ИК) спектроскопии для анализа полученного экстракта [7]. Этот метод достаточно широко

применяют при анализе биологического материала, однако полосы поглощения (ПП), которые соответствуют колебаниям функциональных групп липидов, без предварительной обработки образцов не всегда информативны по причине перекрывания с ПП воды [8–10].

Цель работы – модифицировать метода Фолча для определения содержания липидов в биологическом материале методом ИК-спектроскопии.

Материал и методы. Липиды из биологических образцов и модельных растворов для построения градуировочного (калибровочного) графика экстрагированы с использованием раствора Фолча (хлороформ: этанол = 2 : 1 по объему). При анализе биологического материала 200 мкл образца (плазма крови, слюна и т.д.) разбавляли 800 мкл 0,9% NaCl, затем образцы дважды экстрагировали двумя мл раствора Фолча. Объединенную органическую фазу отстаивали в течение 24 часов, после чего центрифугировали при 7 000 об./мин. для более полного разделения фаз. Осторожно декантировали верхний слой и отбирали нижний для определения липидов методом ИК спектроскопии. Аликвоты экстракта объемом 50 мкл высушивали в течение 30 мин. на подложке из селенида цинка в термостате при 37°C. ИК-спектры поглощения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре «ФТ-801» (фирма Симекс) в диапазоне 500–4000 см⁻¹. Запись спектров проводили с числом сканов 32 с разрешением 4 см⁻¹.

Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи программ Statistica Trial (StatSoft) непа-

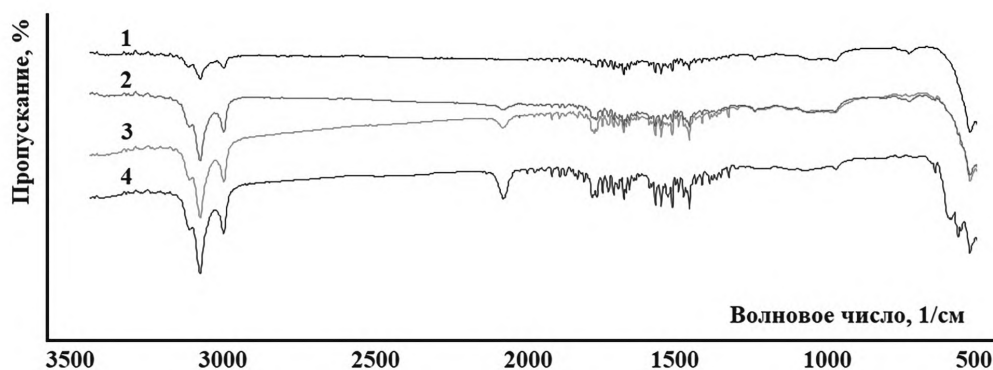


Рис. 1. Построение градуировочного графика для определения содержания липидов.

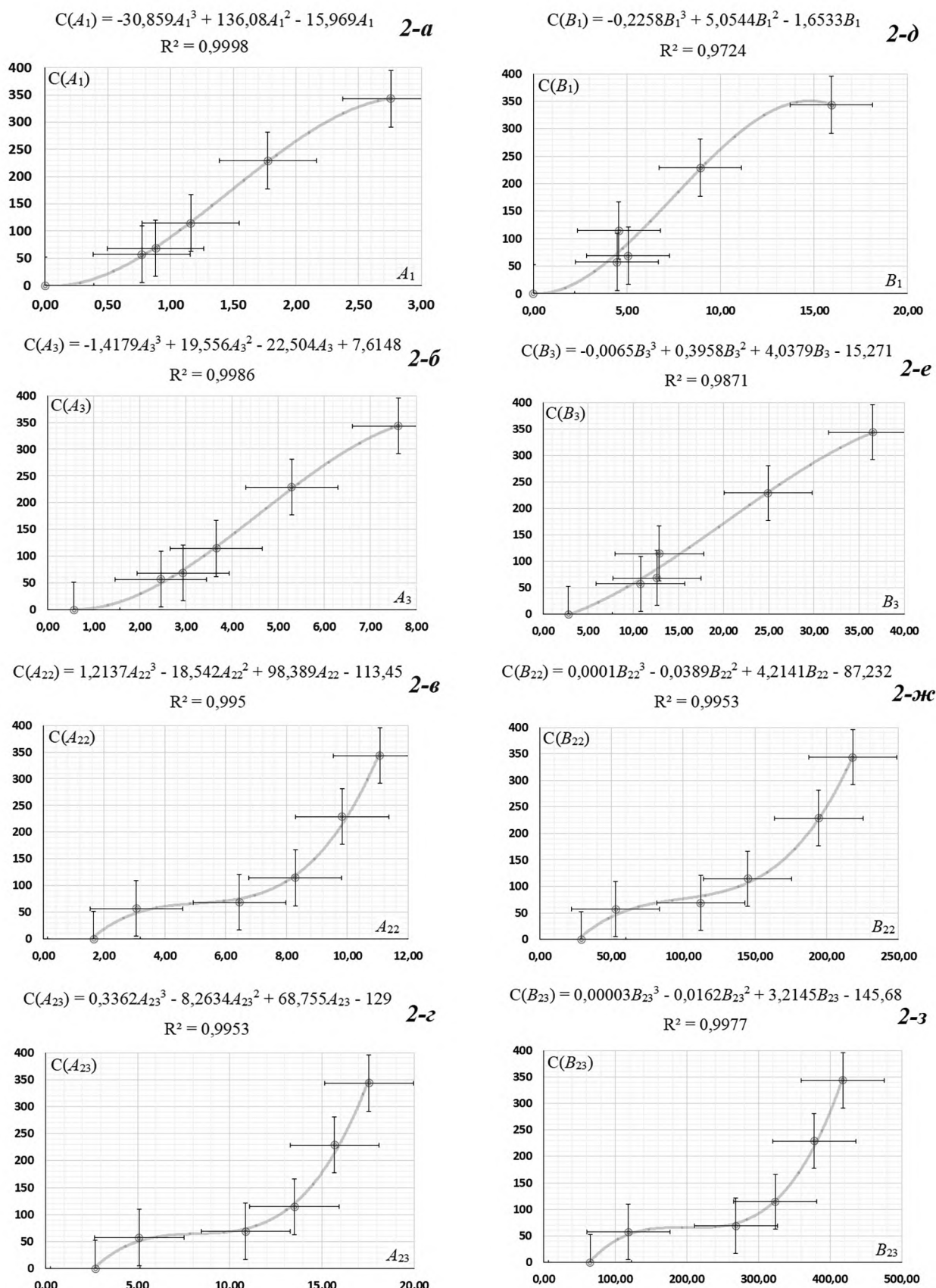


Рис. 2. Результат интерполяции наблюдаемых параметров (а-г – зависимости концентрации липидов от высоты ПП 1396 см⁻¹ (A₁), 1458 см⁻¹ (A₃), 2853 см⁻¹ (A₂₂), 2923 см⁻¹ (A₂₃); д-ж – зависимости концентрации липидов от площади ПП 1396 см⁻¹ (B₁), 1458 см⁻¹ (B₃), 2853 см⁻¹ (B₂₂), 2923 см⁻¹ (B₂₃) соответственно).

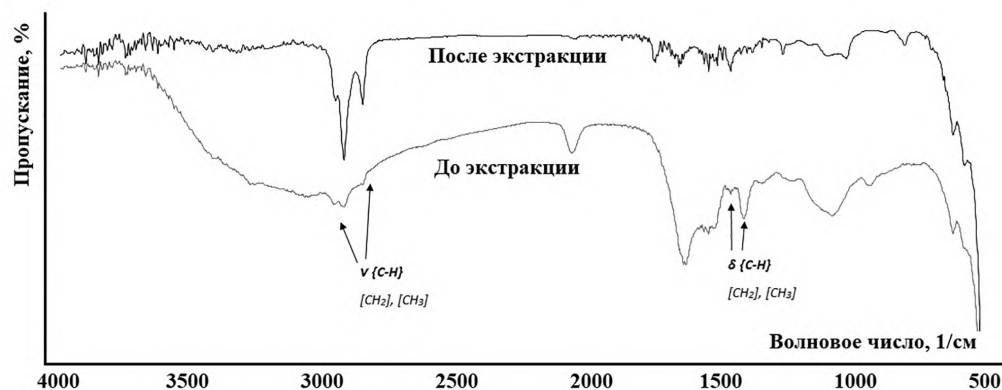


Рис. 3. Пример ИК спектров слюны до и после экстракции липидов.

раметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах -- U-критерия Манна--Уитни. Описание выборки производили с помощью подсчёта медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го процентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Корреляционный анализ провели методом Спирмена.

Результаты и обсуждение. На первом этапе обработки метода построен градуировочный график для определения липидов, при этом в качестве стандартного образца использовали раствор глицерина с концентрацией 2,29 ммоль/л (АО «Вектор-Бест»). Экстракцию проводили по описанной выше схеме, используя 25, 50, 100 и 150 мкл стандартной пробы (растворы 1-4 соответственно) (рис. 1).

В качестве аналитических ПП выбраны полосы соответствующие валентным (ν_s – симметричным, ν_{as} – ассиметричным) и деформационным (δ) колебаниям метильных и метиленовых групп липидов и жирных кислот: 1396 см^{-1} (δCH_3 обозначены как A_1 и B_1), 1458 см^{-1} (δCH_2 , A_3 и B_3), 2853 см^{-1} (νCH_3 , A_{22} и B_{22}), 2923 см^{-1} ($\nu_{as}\text{CH}_2$, A_{23} и B_{23}) и 2957 см^{-1} ($\nu_{as}\text{CH}_3$, A_{24} и B_{24}) [11, 12]. Параллельно провели измерение высоты (A) и площади (B) соответствующих пиков на ИК-спектрах образцов.

Для каждой ПП получены уравнения регрессии, согласно которым максимальные значения коэффициентов корреляции соответствуют деформационным колебаниям, тогда как минимальные ПП 2957 см^{-1} , не учитывали в дальнейшем при построении модели множественной регрессии (см. таблицу).

Получаемые в экспериментальных исследованиях табличные функции несут мало информации. Они определены только в узлах сетки, а их значения в промежуточных точках и даже значения производных в узлах не известны. Однако если значения функции должны быть известны при любом значении аргумента и в самих узлах совпадать с табличными значениями, то данную проблему можно решить с помощью приемов теории приближений. В вычислительной математике нередко одну функцию удается заменить другой,

более информативной для дальнейшей работы, принимая во внимание тот факт, что через любые n заданных точек проходит график полиномиальной функции порядка $n-1$. На рис. 2, a -з изображены соответствующие графики, которые найдены методами функциональной интерполяции для данных из таблицы. При этом очевидно, что интерполяционный многочлен меньшей степени не существует, а большей существует, но не единственен. Именно поэтому интерполяцию стандартно производят многочленами, степень которых на единицу меньше количества узловых точек.

Проанализировав взаимозависимости наблюдаемых величин, остается выбрать модель многофакторной регрессии. Проще всего сопутствующая тому задача оценки решается для моделей с гомоскедастичными независимыми остатками. На случай многомерных рядов переносятся результаты, связанные с оценением необходимого набора регрессоров, в частности, легко получить предельное распределение оценки степени конструируемого полинома [13–15]. Взяв средневзвешенное значение интерполяционных многочленов, с весовыми коэффициентами R^2 , уравнение регрессии примет вид:

$$C = -60,56 - 3,885 \cdot A_1^3 + 17,13 \cdot A_2^2 - 2,010 \cdot A_1 - 0,1782 \cdot A_3^3 + 2,459 \cdot A_2^2 - 2,829 \cdot A_1 + 0,15207 \cdot A_2^2 - 2,3232 \cdot A_2^2 + 12,327 \cdot A_{22}^2 + 0,042137 \cdot A_{23}^3 - 1,0356 \cdot A_{23}^2 + 8,6173 \cdot A_{23} - 0,027649 \cdot B_1^3 + 0,61891 \cdot B_1^2 - 0,20244 \cdot B_1 - 0,00080795 \cdot B_3^3 + 0,049198 \cdot B_3^2 + 0,50191 \cdot A_3 + 0,0000125333 \cdot B_{22}^3 - 0,00487548 \cdot B_{22}^2 + 0,528168 \cdot B_{22} + 0,00000376907 \cdot B_{23}^3 - 0,00203530 \cdot B_{23}^2 + 0,403856 \cdot B_{23}$$

Показано, что погрешность данного уравнения не превышает 16%; при этом наибольший вклад в формирование погрешности вносят параметры B_1 и B_3 . Составляя аналогичное уравнение без этих параметров, обеспечивающее в области $(0; 0; 1; 2; 29; 65) \leq (A_1; A_3; A_{22}; A_{23}; B_{22}; B_{23}) < (3; 8; 12; 18; 219; 419)$ погрешность не более 12%:

$$C = -77,87 - 5,157 \cdot A_1^3 + 22,74 \cdot A_2^2 - 2,669 \cdot A_1 - 0,2367 \cdot A_3^3 + 3,264 \cdot A_3^2 - 3,756 \cdot A_3 + 0,20188 \cdot A_{22}^3 - 3,0842 \cdot A_{23}^2 + 16,366 \cdot A_{23}^3 + 0,055940 \cdot A_{23}^3 - 1,3749 \cdot A_{23}^2 + 11,440 \cdot A_{23} + 0,0000166390 \cdot B_{22}^3 - 0,00647260 \cdot B_{22}^2 + 0,701187 \cdot B_{22} + 0,00000500376 \cdot B_{23}^3 - 0,0270203 \cdot B_{23}^2 + 0,536153 \cdot B_{23}$$

Данная формула позволяет разработать компьютер-

ный метод, который предназначен для оценки результатов влияния описывающих ситуацию факторов на итоговые показатели и друг на друга. Этот метод использует математическую модель многомерного ряда, в которой коэффициенты непосредственного влияния факторов друг на друга и начальные условия задаются интерполяционно. Основные составляющие этого метода следующие: сначала экспериментальным путем определяется список факторов, которые необходимо учитывать при анализе, в данном случае это численные характеристики ИК спектров образцов. Основная часть перечисленных в модели факторов носит не качественный, а количественный характер, при этом обладает устойчивостью информации о наблюдаемой величине и отражает ее способность реагировать на изменения исходных данных без нарушения необходимой точности. Далее определяем необходимые для работы модели начальные уровни факторов, соответствующие начальному состоянию изучаемого объекта (проведение оцифровки переменных). Затем составляем схему непосредственных влияний факторов друг на друга, оценивая степень непосредственных влияний. И, наконец, просчитываем итерации (опосредованные влияния второго, третьего и т. д. уровней, которые соответствуют второму, третьему и т. д. параметрам), вплоть до формирования стабильного состояния. Результат работы модели показывает конечные уровни факторов в виде мультипликативных константных значений с погрешностью близкой к нулевой. Дополнительно проведена проверка работоспособности методики методом «введено-найдено». Для этого в 5 образцов слюны дополнительно ввели 25 мкл глицерина с концентрацией 2,29 ммоль/л. Во всех случаях проведено определение концентрации липидов с погрешностью, которая не превышала 5,7%.

Таким образом, предложенный метод позволяет без стадии очистки липидов от нелипидных примесей проводить количественное определение липидов в биологическом материале, поскольку ПП, соответствующие колебаниям метильных и метиленовых групп липидов не пересекаются с ПП белков и нуклеиновых кислот. В качестве примера приведены ИК спектры слюны до и после экстракции липидов (рис. 3).

На следующем этапе проведено параллельное определение концентрации липидов в образцах слюны 30 здоровых добровольцев методом ИК спектроскопии и традиционным ферментативным методом с использованием набора «Триглицериды-Ново» («Вектор-Бест», г. Новосибирск). Установлено, что в первом случае содержание липидов составило 0,038 [0,025; 0,062] ммоль/л, тогда как во втором – 0,044 [0,032; 0,054] ммоль/л, при этом корреляция между значениями, определенными разными методами статистически достоверна ($r=0,7815$). Более высокое значение концентрации липидов, определенное ферментативным методом, может быть объяснено отсутствием этапа экстрагирования липидов, с одной стороны. С другой стороны, несмотря на низкое содержание липидов в слюне, некоторые образцы дают завышенное значение из-за мутности слюны, которая опять же обусловлена

отсутствием экстракции и стадии очистки от нелипидных примесей. Таким образом, мы определили концентрация липидов с погрешностью 13,6% по сравнению с традиционным методом. Это позволило нам применить предложенную модификацию метод ИК спектроскопии для количественной и полуколичественной оценки содержания липидов в биологических образцах.

Показано, что интенсивности ПП липидов существенно возрастают, что в свою очередь обеспечивает большую точность определения характеристик спектров (высоты, площадь пиков) и может дать ценную информацию об изменениях в структуре липидов, в процессе становления афизиологических процессов в организме человека (рис. 3). В частности, известно, что интервал 3050-2800 cm^{-1} , который содержит колебания метильных и метиленовых групп насыщенных и ненасыщенных алкильных цепей, может оказаться полезным для оценки проницаемости мембран клеток, а также процессов окислительной модификации белков [16]. Потенциально информативным может быть отношение интенсивностей 2955/2921 cm^{-1} , которое показывает соотношение разветвленных и неразветвленных молекул липидов и жирных кислот (CH_3/CH_2). Например, на фоне онкологической патологии это соотношение ниже, чем в норме [17], что указывает на менее разветвленные цепи и /или более длинные цепи липидов и жирных кислот в данном случае по сравнению с нормой.

Заключение. С применением предложенной модификации метода ИК спектроскопии при дальнейшем его совершенствовании будет возможно определять не только общее содержание липидов в биологических средах, но и рассчитывать соотношения интенсивностей ПП в спектрах. Это позволит нам получать более существенную информацию для диагностического процесса.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ариповский А.В., Колесник П.О., Веждел М.И., Титов В.Н. Метод подготовки проб для газохроматографического определения жирных кислот без предварительной экстракции липидов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 1: 3-6.
2. Канская Н.В., Иванов В.В., Степовая Е.А., Позднякова И.А., Федорова Н.А. Модификация способа определения липидов. *Сибирский медицинский журнал*. 2014; 29 (1): 69-73.
3. Jeannotte R., Hamel C., Jabaji S., Whalen J.K. Comparison of solvent mixtures for pressurized solvent extraction of soil fatty acid biomarkers. *Talanta*. 2008; 77: 195-9.
4. Ichihara K., Yamaguchi C., Araya Y., Sakamoto A., Yoneda K. Preparation of fatty acid methyl esters by selective methanolysis of polar glycerolipids. *Lipids*. 2010; 45 (4): 367-74.
5. Yin H., Cox B.E., Liu W., Porter N.A., Morrow J.D., Milne G.L. Identification of intact oxidation products of glycerophospholipids in vitro and in vivo using negative ion electrospray iontrap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2009; 44: 672-80.
6. Guo S., Lu J., Zhuo Y., Xiao M., Xue X., Zhong S., Shen X., Yin C., Li L., Chen Q., Zhu M., Chen B., Zhao M., Zheng L., Tao Y., Yin H. Endogenous cholesterol ester hydroperoxides modulate cholesterol

- levels and inhibit cholesterol uptake in hepatocytes and macrophages. *Redox Biology*. 2019; 21: 101069.
- Oleszko A., Olsztyńska-Janus S., Walski T., Grzeszczuk-Kuć K., Bujok J., GaBecka K., Czernski A., Witkiewicz W., Komorowska M. Application of FTIR-ATR Spectroscopy to Determine the Extent of Lipid Peroxidation in Plasma during Haemodialysis. *BioMed Research International*. 2015. Article ID 245607, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/245607>
 - Олесько А., Олсзтыńska-Janус S., Валски Т., Грзещцук-Куц К., Бужок J., ГаБеcka K., Чзерски А., Виткiewicz W., Коморовска М. Application of FTIR-ATR Spectroscopy to Determine the Extent of Lipid Peroxidation in Plasma during Haemodialysis. *BioMed Research International*. 2015. Article ID 245607, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/245607>
 - Джатдоева А.А., Полимова А.М., Проскурина Е.В., Проскурин М.А., Владимиров Ю.А. Определение липидов и продуктов их окисления методом ИК-спектроскопии. *Журнал аналитической химии*. 2016; 76 (6): 570-6.
 - Olsztyńska-Janus S., Pietruszka A., Kielbowicz Z., Czarnecki M.A. ATR-IR study of skin components: Lipids, proteins and water. Part I: Temperature effect. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017; 188: 37–49.
 - Orphanou C.-M. The Detection and Discrimination of Human Body Fluids Using ATR FT-IR Spectroscopy[®]. *Forensic Science International*. 2015;252: e10-e16.
 - Dreissig I., Machill S., Salzer R., Krafft C. Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009; 71 (5): 2069–75.
 - Rohman A., Che Man Y.B. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy combined with Chemometrics for authentication of cod-liver oil. *Vibrational Spectroscopy*. 2011; 55 (2) 141–5.
 - Brown T.A. Confirmatory Factor Analysis for Applied Research. Methodology in the Social Sciences edition. 2nd Edition. Guilford Publications; 2006.
 - Fabrigar L.R., Wegener D.T., Exploratory Factor Analysis (Understanding Statistics). 1st Edition. Oxford University Press; 2011.
 - Zhang L., Zeigler B.P., LaiLi Y. Model Engineering for Simulation. 1st Edition. Academic Press; 2019.
 - Petibois C., Délérís G. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. *Trends in Biotechnology*. 2006; 24 (10): 455–62.
 - Sheng D., Xu F., Yu Q., Fang T., Xia J., Li S., Wang X. A study of structural differences between liver cancer cells and normal liver cells using FTIR spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 2015; 1099:18–23.
 - Jeannotte R., Hamel C., Jabaji S., Whalen J.K. Comparison of solvent mixtures for pressurized solvent extraction of soil fatty acid biomarkers. *Talanta*. 2008; 77: 195-9.
 - Ichihara K., Yamaguchi C., Araya Y., Sakamoto A., Yoneda K. Preparation of fatty acid methyl esters by selective methanolysis of polar glycerolipids. *Lipids*. 2010; 45 (4): 367–74.
 - Yin H., Cox B.E., Liu W., Porter N.A., Morrow J.D., Milne G.L. Identification of intact oxidation products of glycerophospholipids in vitro and in vivo using negative ion electrospray iontrap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2009; 44: 672–80.
 - Guo S., Lu J., Zhuo Y., Xiao M., Xue X., Zhong S., Shen X., Yin C., Li L., Chen Q., Zhu M., Chen B., Zhao M., Zheng L., Tao Y., Yin H. Endogenous cholesterol ester hydroperoxides modulate cholesterol levels and inhibit cholesterol uptake in hepatocytes and macrophages. *Redox Biology*. 2019; 21: 101069.
 - Oleszko A., Olsztyńska-Janus S., Walski T., Grzeszczuk-Kuć K., Bujok J., GaBecka K., Czernski A., Witkiewicz W., Komorowska M. Application of FTIR-ATR Spectroscopy to Determine the Extent of Lipid Peroxidation in Plasma during Haemodialysis. *BioMed Research International*. 2015. Article ID 245607, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/245607>
 - Dzhatdoyeva A.A., Polimova A.M., Proskurina Ye.V., Proskurin M.A., Vladimirov YU.A. Determination of lipids and their oxidation products using IR spectroscopy. *Zhurnal analiticheskoy khimii*. 2016; 76 (6): 570-6. (in Russian)
 - Olsztyńska-Janus S., Pietruszka A., Kielbowicz Z., Czarnecki M.A. ATR-IR study of skin components: Lipids, proteins and water. Part I: Temperature effect. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017; 188: 37–49.
 - Orphanou C.-M. The Detection and Discrimination of Human Body Fluids Using ATR FT-IR Spectroscopy[®]. *Forensic Science International*. 2015;252: e10-e16.
 - Dreissig I., Machill S., Salzer R., Krafft C. Quantification of brain lipids by FTIR spectroscopy and partial least squares regression. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009; 71 (5): 2069–75.
 - Rohman A., Che Man Y.B. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy combined with Chemometrics for authentication of cod-liver oil. *Vibrational Spectroscopy*. 2011; 55 (2) 141–5.
 - Brown T.A. Confirmatory Factor Analysis for Applied Research. Methodology in the Social Sciences edition. 2nd Edition. Guilford Publications; 2006.
 - Fabrigar L.R., Wegener D.T., Exploratory Factor Analysis (Understanding Statistics). 1st Edition. Oxford University Press; 2011.
 - Zhang L., Zeigler B.P., LaiLi Y. Model Engineering for Simulation. 1st Edition. Academic Press; 2019.
 - Petibois C., Délérís G. Chemical mapping of tumor progression by FT-IR imaging: towards molecular histopathology. *Trends in Biotechnology*. 2006; 24 (10): 455–62.
 - Sheng D., Xu F., Yu Q., Fang T., Xia J., Li S., Wang X. A study of structural differences between liver cancer cells and normal liver cells using FTIR spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 2015; 1099:18–23.

REFERENCES

- Aripovskiy B., Kolesnik P.O., Vezhdel M.I., Titov V.N. The method of sample preparation for gas chromatographic determination of fatty acids without preliminary extraction of lipids. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 1: 3-6. (in Russian)
- Kanskaya N.V., Ivanov V.V., Stepovaya Ye.A., Pozdnyakova I.A., Fedorova N.A. Modification of the method of determining lipids. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 29 (1): 69-73. (in Russian)

Поступила 27.02.19
Принята к печати 20.03.19

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В., Соменова О.В., Елизарова А.Л., Добровольская М.М., Харитиди Т.Ю., Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е., Бобрышев А.А., Кононенко И.Б., Снеговой А.В.

РАЗРАБОТКА СТРАТЕГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К СОВРЕМЕННОЙ ДИАГНОСТИКЕ АНЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

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

Проведено исследование клинического анализа крови и основных метаболитов феррокинетики у 107 пациенток РМЖ, до лечения. У 31 (28,9 %) пациентки выявили АС. Особенностью АС является выраженный микроцитоз, гипохромия эритроцитов и низкое содержание гемоглобина в ретикулоцитах. Чаще всего (n=22; 71 %) встречалась ЖДА, которая характеризовалась низкой концентрацией Ж, ФР, ГП25, ИЛ-6 и высокой - рРТФ, ТРФ. У 9 (29%) пациенток с АС, на основании высокой концентрации ФР, ГП25, ИЛ-6, была установлена АХЗ с функциональным дефицитом железа (ФДЖ). У 23 (74,2%) пациенток с АС отмечался дефицит ЭПО, самые низкие показатели выявлены в группе больных с распространенным опухолевым процессом и ФДЖ, в меньшей степени, у больных с ЖДА.

Ключевые слова: рак молочной железы; анемия; гепцидин; интерлейкин-6; ферритин; растворимые рецепторы трансферрина; эритропоэтин

Для цитирования: Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В., Соменова О.В., Елизарова А.Л., Добровольская М.М., Харитиди Т.Ю., Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е., Бобрышев А.А., Кононенко И.Б., Снеговой А.В. Разработка стратегических подходов к современной диагностике анемического синдрома у больных раком молочной железы. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (4): 210-215. DOI://<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-210-215>

Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V., Somonova O.V., Elizarova A.L., Dobrovolskaya M.M., Kharitidi T.Yu., Lyubimova N.V., Kushlinsky N.E., Bobryshev A.A., Kononenko I.B., Snegovoy A.V.

THE DEVELOPMENT OF THE STRATEGIC APPROACHES TO MODERN DIAGNOSIS OF ANEMIC SYNDROME IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», under the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russian Federation

A study of the clinical analysis of blood and major metabolites of ferrokinetics in 107 breast cancer patients before treatment was conducted. In 31 (28.9%) patients revealed anemic syndrome (AS). A feature of the AS is pronounced microcytosis, erythrocyte hypochromia and low hemoglobin content in reticulocytes. Most often (n = 22; 71%) there was iron deficiency (IDA), which was characterized by a low concentration of iron (F), ferritin (FR), hepcidin 25 (GP25), interleukin-6 (IL-6) and high - soluble transferrin receptors (rTFR), transferrin (TRF). In 9 (29%) patients with AS, on the basis of a high concentration of FR, GP25, IL-6, the anemia of chronic disease (AHZ) with functional iron deficiency (FDI) was established. In 23 (74.2%) patients with AS, there was a deficiency of erythropoietin (EPO), the lowest rates were found in the group of patients with a common tumor process and FDI, with less in patients with IDA.

Key words: *mammary cancer; anemia; hepcidin; interleukin-6; ferritin; soluble transferrin receptors; erythropoietin.*

For citation: *Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V., Somonova O.V., Elizarova A.L., Dobrovolskaya M.M., Kharitidi T.Yu., Lyubimova N.V., Kushlinsky N.E., Bobryshev A.A., Kononenko I.B., Snegovoy A.V. Development of strategic approaches to modern diagnosis of anemic syndrome in patients with breast cancer. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (4): 210-215 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-210-215>*

For correspondence: *Blindar Valentina Nikolaevna, Dr. of Biological sciences, leading researcher; e-mail: bld51@list.ru*

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

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 06.03.2019
Accepted 11.03.2019

Введение. По литературным данным у 30% пациенток раком молочной железы (РМЖ) еще до лечения выявляется анемический синдром (АС) и если его не лечить, то на фоне химиотерапии он становится более выраженным и развивается у большинства из них [1,

2]. АС значительно ухудшает прогноз основного заболевания и может способствовать развитию гнойно-септических инфекций в раннем послеоперационном периоде. АС наряду с размером опухоли и стадией заболевания рассматривают как независимый фактор прогноза, влияющий на выживаемость [3,4]. Нормализация уровня гемоглобина при химиотерапии РМЖ приводит к увеличению, как общей выживаемости,

Для корреспонденции: Блиндарь Валентина Николаевна, д-р. биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: bld51@list.ru

так и выживаемости без прогрессирования [1, 2]. Гипоксия тканей, как следствие АС может значительно снизить эффективность химио- и лучевой терапии. В злокачественных клетках, в состоянии кислородного голодания меняется метаболизм, включаются механизмы приспособления. В результате гипоксии активизируются гены семейства HIF-1 [5]. Эти гены, в свою очередь, могут запустить серию молекулярных aberrаций, в частности, усиливается продукция сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). Патогенез АС онкологических больных чрезвычайно сложен. Он представлен большим разнообразием факторов, лежащих в основе его развития и, недостаточно изучен [6,7]. Необходимость выбора вариантов лечения АС делает актуальной проблему дифференциальной диагностики анемии и раннего её выявления. Целью исследования является комплексное изучение количественных и качественных показателей периферической крови, в том числе показатели феррокинетики при РМЖ. Это необходимо для прогнозирования развития АС, ранней диагностики и его коррекции перед проведением ХТ или оперативного вмешательства у пациенток РМЖ.

Материал и методы. В исследование включено 107 пациенток РМЖ, поступивших на лечение в клинику НМИЦ с 2009 по 2017 гг. Возраст от 31 до 89 (61,5±5,7) лет. Контрольная группа составила 37 практически здоровых женщин соответствующего пола и возраста. Расширенный клинический анализ крови с ретикулоцитограммой выполняли на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ-2100. В плазме крови методом иммуноферментного анализа определяли содержание ферритина (ФР) с помощью наборов фирмы «Orgentec Diagnostica GmbH» (Германия), растворимых рецепторов трансферрина (рРТФ) фирмы «BioVendor» (Чехия), уровень эндогенного эритропоэтина (ЭПО) с использованием наборов фирмы «Biomerica» (США), гепсидина 25 (ГП25) с наборами «Peninsula Laboratories International, Inc.» (США) и интерлейкин-6 (ИЛ-6)-с помощью наборов Bender MedSystem (Австрия). Подсчитывали лейкоцитарную формулу и проводили детальный анализ морфологии эритроцитов. Число гипохромных (НУРО) эритроцитов определяли на анализаторе Advia-120 (США).

Исследование биохимических показателей обмена

железа проводилось у части ($n=22$) пациенток в сыворотке крови на автоматическом анализаторе Cobas c501 (Roche). Определение железа исследовали колориметрическим методом при помощи набора реактивов «Iron Gen.2». Уровень трансферрина был получен иммунотурбидиметрическим методом с латексным усилением на основе специфических антисывороток при использовании тест-систем «Tina-quant Transferrin ver.2». С-реактивный белок исследовали иммунотурбидиметрическим методом с латексным усилением на основе специфических антисывороток с использованием тест-системы C-Reactive Protein Gen.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программных пакетов «MS-EXCEL» «BIOSTAT» Version 4.03. Для оценки достоверности результатов использовали t -критерий Стьюдента а при непараметрическом распределении – с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Проведенные исследования выполнялись в соответствии с принципами Хельсинкской Декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией.

Результаты и обсуждение. АС у онкологических больных имеет мультифакторное происхождение. Наиболее общим звеном патогенеза анемии является участие провоспалительных цитокинов, в частности, ИЛ-6, который индуцирует экспрессию гепатоцитами железо-регуляторного гормона гепсидина, подавляют продукцию эритропоэтина почками и снижают чувствительность к нему предшественников эритроцитов, угнетают дифференцировку, пролиферацию и инициируют апоптоз гемопоэтических клеток [8] (рис. 1). В настоящее время считают, что основную роль в метаболизме железа играет гепсидин или в другой транскрипции гепсидин 25 (ГП25). ГП25 является 25-аминокислотным пептидом, который синтезируется в печени [4,8]. Экспериментально доказано, что ГП25 относится к отрицательным регуляторам метаболизма железа, при избытке железа его уровень значительно повышается, тем самым снижается всасывание и рециркуляция железа, при недостатке они снижаются, то есть синтез ГП25 гепатоцитами направлен на предупреждение перегрузки организма железом. Железо экспортируется из тканей с помощью ферропор-

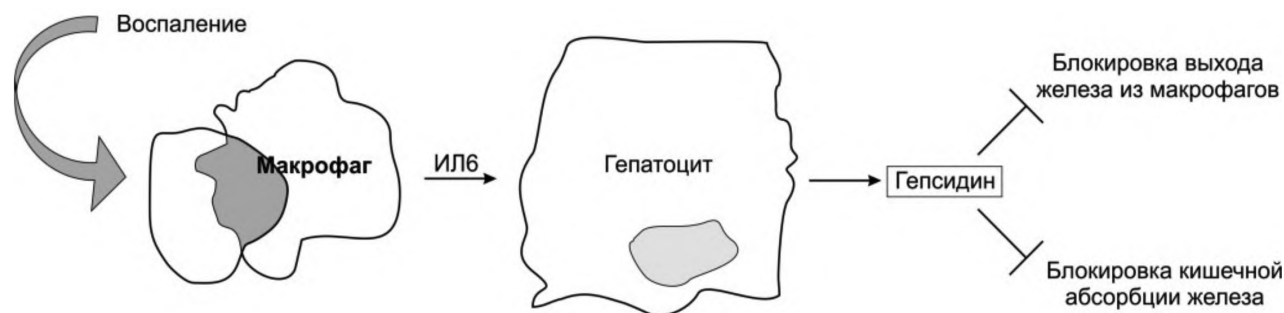


Рис. 1. Регуляция продукции гепсидина при воспалении, (Nemeth E., Rivara S., Gabajan V. et al. И6 mediates hypo-ferramia inducing the synthesis of the iron regulatory hormone J. Clin. Inv. 2004; 113(9): 1271–1276).

тина — основного клеточного транспортера железа и рецептора для ГП25. ГП25 снижает функциональную активность ферропортина, связывается с ним и вызывает его деградацию. Показано [8, 7], что под воздействием ИЛ-6 ГП25 блокирует ферропортины и, следовательно, высвобождение железа макрофагами. Развивается функциональный дефицит железа. Функциональным дефицитом железа называют ситуацию, когда, несмотря на достаточные его запасы, эритропоэз неадекватно обеспечивается железом. В периферической крови появляются эритроциты с низким объемом и гипохромией. Такая же морфологическая картина отмечается при ЖДА, поэтому необходимым дифференциально-диагностический критерий выявления АС с функциональным дефицитом железа. По предварительным данным, проведенным нами ранее, это может быть метод определения ГП25 в комплексе с ИЛ-6 [7].

На экспериментальных моделях и у добровольцев было показано, что внутривенное введение ИЛ-6 сопровождается повышением продукции ГП25 с последующим развитием гипоферремии и железодефицитного эритропоэза, а при длительном воздействии провоспалительных цитокинов развивается анемия хронического заболевания. ИЛ-6 является одним из важнейших медиаторов острой фазы воспаления. ИЛ-6 синтезируется активированными макрофагами, Т-клетками и стимулирует иммунный ответ [8]. Из литературных источников [9-11] известно, что ИЛ-6 может продуцироваться также опухолевыми клетками различного гистогенеза. В подавляющем большинстве случаев опухолевая прогрессия сопровождается увеличением уровня ИЛ-6 у пациенток раком молочной железы.

Концентрация HGB в контрольной группе ($n=37$) составила в среднем: $137 \pm 12,9$ г/л.; $RET-HE=28,7 \pm 2,1$ пг; $Ж=15,6 \pm 1,7$ мкмоль/л; $ТФР=246,3 \pm 11,6$ мг/дл;

$рТФР=0,9 \pm 0,08$ мкг/мл; $ФР=79,3 \pm 6,9$ нг/мл; $ЭПО=15,4 \pm 2,7$ МЕ/мл; $СРБ=2,7 \pm 1,3$ мг/л; $НУРО=1,5 \pm 0,04\%$. Исследование содержания ГП25 и ИЛ-6 проведено у 17 женщин. Величина ИЛ-6 не превышала 4,6 пг/мл, в среднем составив $2,0 \pm 0,4$ пг/мл. Показатели ГП25 колебались в более широких пределах (0,8–7,5 нг/мл), в среднем по группе составили $4,3 \pm 0,7$ нг/мл. Уровень ЭПО находился в пределах нормальных колебаний ($2,8–32,4$ МЕ/мл). Современные автоматические анализаторы крови дали объективную информацию о состоянии кроветворения больных. На основании клинического анализа крови были выделены 2 группы пациенток: 1-я с нормальными показателями красной крови ($n=76$), 2-я с АС ($n=31$; 28,9%).

Концентрация гемоглобина (HGB) в 1-й группе составила в среднем $129 \pm 11,0$ г/л при диапазоне 122–146 г/л. Несмотря на отсутствие АС у больных этой группы, на фоне нормальных показателей гемограммы, у значительной части пациенток ($n=25$; 32,9%) выявили низкое содержание ФР ($17,6 \pm 1,6$ нг/мл), а показатели рТФ ($1,8 \pm 0,6$ мкг/мл), НУРО ($2,9 \pm 0,06\%$), превышали верхнюю границу нормы, что не исключало начальной или предлатентной стадии ЖДА. У 7 пациенток (9,2%) отмечена высокая концентрация ФР ($189,4 \pm 27,2$ нг/мл), с разбросом показателей от 144 до 254 нг/мл, Медиана=169,5 нг/мл. У единичных пациенток показатели ФР, ГП25, ИЛ-6 значительно превышали верхнюю границу нормы, что свидетельствовало об избытке Ж, а, возможно, о функциональном дефиците железа.

Больные с анемией имели одинаковые морфологические признаки эритроцитов крови, а именно микроцитоз ($MCV=76,3 \pm 1,3$ фл) и гипохромия ($MCH=23,4 \pm 0,6$ пг), число гипохромных эритроцитов значительно превышало норму и составило ($НУРО=27,4 \pm 1,5\%$). Уровень HGB колебался от 79 до 117 г/л и в среднем по группе составил $86,5 \pm 9,1$ г/л, преоблада-

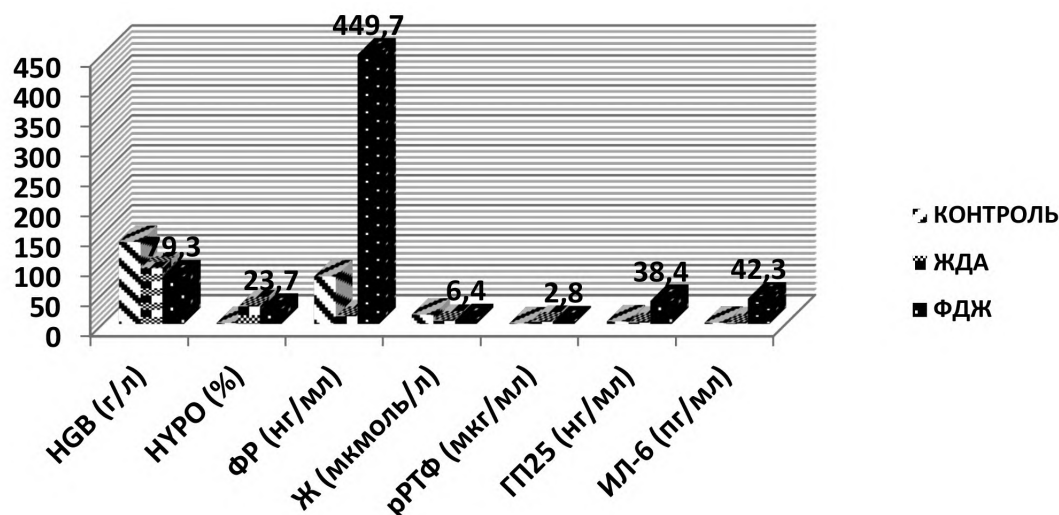


Рис. 2. Основные показатели метаболизма железа у пациенток РМЖ с разными типами анемического синдрома (ЖДА и ФДЖ) по сравнению с контролем.

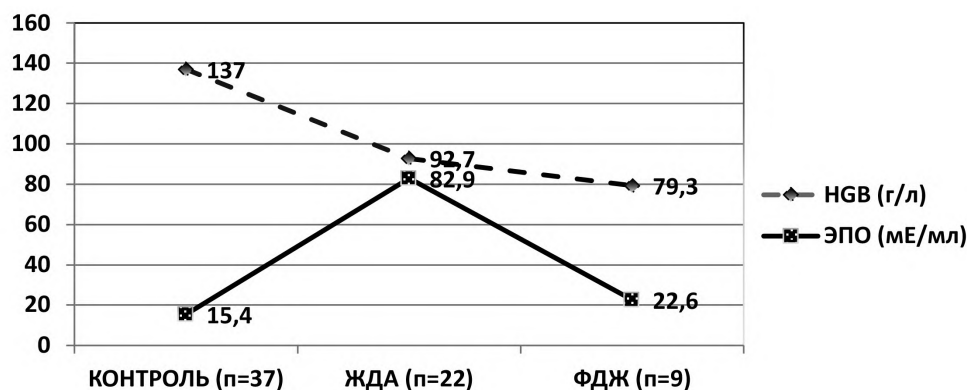


Рис. 3. Адекватность гормонального ответа (ЭПО, HGB – по оси ординат) на степень тяжести анемии у пациенток с ЖДА и ФДЖ по сравнению с контролем (по оси абсцисс).

ли больные АС I и II степени тяжести. В анализаторах высшего класса возможно определение гемоглобина в ретикулоцитах (RET-HE). Это имеет важное диагностическое значение, так как в отличие от эритроцитов ретикулоциты характеризуются коротким сроком жизни. Они формируются и созревают в костном мозге за 1—2 дня, после чего покидают его и еще 1—3 дня дозревают в кровотоке [12,13]. Показатель RET-HE дает четкое представление о количестве гемоглобина во вновь поступающих из костного мозга эритроцитах. У пациентов с АС этот показатель в среднем по группе был низким ($23,8 \pm 0,6$) пг и достоверно ($p < 0,01$) отличался от нормальных значений, в норме RET-HE колебался от 28 до 35 пг ($30,9 \pm 1,7$ пг).

При анализе показателей ФР, рРТФ, ГП25 среди пациентов 2-й группы были выделены два типа АС (рис. 2). Первый тип – истинная ЖДА ($n = 22$) с очень низкой концентрацией ФР ($12,8 \pm 1,9$ нг/мл), Ж ($5,2 \pm 0,7$ мкмоль/л) и высокой концентрацией рРТФ ($3,6 \pm 0,5$ мкг/мл), ТФР ($346,3 \pm 9,5$ мг/дл) по сравнению с контролем. Среди пациенток с ЖДА преобладали больные РМЖ 1-2-й стадией заболевания. Анализ показателей ИЛ-6 и ГП25 выявил достоверное ($p < 0,02$) снижение их содержания по сравнению с контрольной группой: ИЛ-6 составил $0,8 \pm 0,05$ пг/мл и ГП25 $2,2 \pm 0,09$ нг/мл, что достоверно ниже, чем в контрольной группе. Следует отметить, что у пациенток с ЖДА встречались единичные случаи высокой экспрессии ИЛ-6. Показатели СРБ были в пределах нормальных значений и составили $2,8 \pm 0,5$ мг/л.

АС второго типа (рис. 2) диагностирован у 9 женщин. Все пациентки были с распространенным опухолевым процессом (3-4 стадия). Показатели ФР ($449,7 \pm 21,9$ нг/мл), ГП25 ($38,4 \pm 3,9$ нг/мл), ИЛ6 ($42,3 \pm 9,1$ пг/мл) у них, в отличие от ЖДА, значительно ($p < 0,001$) превышали норму. При этом концентрация рРТФ ($2,8 \pm 0,3$) мкг/мл, как и в группе с ЖДА, была высокой, а Ж ($6,2 \pm 0,7$ мкмоль/л) низкой, что в большей степени свидетельствовало о функциональном дефиците железа на фоне анемии хронического заболевания (АХЗ).

Лечение АХЗ с ФДЖ представляет сложную за-

дачу. Достижения в понимании патофизиологии АХЗ позволили определить основные подходы к ее терапии: лечение основного заболевания, использование агентов усиливающих эритропоэз (рекомбинантные эритропоэтины) и доступность железа. Недавно в клинической практике [2] появился новый препарат для внутривенного введения – железа карбоксималтозат (феринжект), показавших высокую эффективность, как в комбинации с ЭПО, так и в монорежиме. Считают, что феринжект обладает хорошей переносимостью и минимальным риском развития аллергических реакций. Однако, стратегию будущего связывают с применением антагонистов ГП25 с целью преодоления задержки железа в ретикулоэндотелиальной системе, гормонов или цитокинов, способных эффективно стимулировать эритропоэз при воспалении. При АХЗ, часто устойчивой к терапии ЭПО, подавление ГП25 может привести к выходу депонированного в макрофагах Ж (Fe) и, соответственно, нормализации уровня HGB. В настоящее время проводится изучение новых лекарственных средств, мишенью которых являются основные патогенетические звенья АХЗ, в частности цитокины, корректоры ветви ИЛ-6 — гепцидин - ферропортин. Такое воздействие рекомбинантным ГП25 на кроветворение показано в эксперименте [14, 15]. Полученные в эксперименте антитела к рецептору интерлейкина-6 способствовали снижению выработке ГП25 и нормализации кроветворения [14]. Однако, большая часть разработок находится в стадии экспериментальных исследований, другие — на разных стадиях клинических исследований [16]. Новые стратегии в патогенетической терапии больных с анемией при хронических болезнях и опухолях связаны с применением антигепцидиновых препаратов, представленных антителами к гормону, ингибиторами и блокаторами его экспрессии, включая эритроферрон, гормон эритробластов [16,17,18]. Большое значение для дифференциальной диагностики АС имеет определение ЭПО в плазме крови. ЭПО является ключевым регулятором эритропоэза [19]. Неадекватно низкая продукция ЭПО по отношению к степени АС — характерная особенность АХЗ и в

меньшей степени – ЖДА [7]. Для оценки адекватности гормонального ответа на степень тяжести анемии у большинства больных АС определяли концентрацию эндогенного ЭПО. Анализируя уровень ЭПО, следует сказать, что его повышение отмечается при состоянии гипоксии. Среди пациенток с АС ($n = 31$) высокая концентрация ЭПО более 100 МЕ/мл отмечена у 8 человек (25,8%) с при диапазоне от 59 до 223 МЕ/мл. У 23 человек (74,2%) показатели ЭПО колебались от 2,9 до 41,7 МЕ/мл, т.е. был неадекватным степени тяжести АС. Как показало наше исследование, более низкая продукция ЭПО отмечалась у большинства больных с ФДЖ, а следовательно, у пациентов с распространенным опухолевым процессом (III - IV стадия), в меньшей степени - у пациентов с ЖДА

Выводы:

У 31 (28,9%) пациентки РМЖ, еще до лечения, является АС. Особенностью АС у всех больных РМЖ с АС является выраженный микроцитоз, гипохромия эритроцитов и низкое содержание RET-HE.

Чаще всего ($n=22; 71\%$) у пациенток с АС встречалась ЖДА, которая характеризовалась низкой концентрацией Ж, ФР, ГП25, ИЛ-6 и высокой - рРТФ, ТРФ

У 9 (29%) пациенток РМЖ с АС на основании высокой концентрации ФР, ГП25, ИЛ-6 была установлена АХЗ с ФДЖ

У 74,2% ($n=23$) пациенток РМЖ с АС отмечался дефицит ЭПО. Самые низкие показатели ЭПО выявлены в группе больных с распространенным опухолевым процессом и ФДЖ, в меньшей степени, у больных с ЖДА.

Заключение. Таким образом, определение уровня ГП25, ИЛ-6 в комплексе с другими традиционными методами, характеризующими АС (оценка концентрации железа, трансферрина, ферритина, растворимых рецепторов трансферрина, клиническим анализом крови, особенно, RET-HE), позволяет провести более объективную оценку метаболизма железа. АС с микроцитарными, гипохромными характеристиками эритроцитов у пациенток РМЖ не всегда указывает на дефицит железа, а может свидетельствовать о функциональных нарушениях метаболизма железа на фоне злокачественного новообразования. Важно дифференцировать ЖДА от ФДЖ при АХЗ, так как подходы к лечению принципиально различаются. Стратегию будущего связывают с применением антагонистов ГП25, ИЛ-6, включая эритроферрон, гормона эритробластов с целью преодоления задержки железа в ретикулоэндотелиальной системе, гормонов или цитокинов, способных эффективно стимулировать эритропоэз при АХЗ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Птушкин В.В. Анемия и дефицит железа у онкологических больных. *Клиническая онкогематология*. 2013; 6 (1): 91—6.
2. Снеговой А.В., Ларионова В.Б., Манзюк Л.В., Кононенко И.Б. Анемия в онкологии: возможности поддерживающей терапии. *Клиническая онкогематология*. 2016; 3(9): 326—35.

3. Barrett-Lee P. J., Ludwig H., Birgegard G., Bokemeyer C., Gascon P., Kosmidis P.A., Krzakowski M., Nortier J.W., Kongable G., Schneider M., Schrijvers D., VanBelle S.J. Independent risk factors for anemia in cancer patients receiving chemotherapy: results from the European Cancer Anemia Survey. *Oncology*. 2006; 70 (1): 34—4.
4. Pigeon C., Igin G., Courselaud A. A new mouse liver-specific protein homologous to human antibacterial peptide hepcidin is overexpressed during iron overload. *Journal Biological Chemistry*. 2001; 276: 7811—9.
5. Мазуренко Н.Н., Куштинский Н.Е. Молекулярно-генетические маркеры немелкоклеточного рака легкого. *Молекулярная медицина*. 2014; 4: 4—13.
6. Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders; therapeutic implication. *J. hepatology*. 2011; 54(1): 173—81.
7. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Матвеева И.И. Новая концепция диагностики анемии с нарушением метаболизма железа. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина*. 2015—2016; 4-1 (26): 77—85.
8. Nemeth E., Rivera S., Gabajan V. IL6 mediates hypoferrremia inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *Journal Clinical Investigation*. 2004; 113(9): 1271—6.
9. Алехнович, Л. И. Характеристика биохимических маркеров метаболизма костной ткани. *Реценз.* 2009; 2: 17—25.
10. Ibricevic-Balic L. Dilemma: Correlation Between Serum Level of Hepsidin and IL-6 Anemic Myeloma Patients. *Med. Arch*. 2016; 70 (6): 429—32.
11. Kan Zhai, Yong Yang, Zhi-Gang Gao, Jie Ding. Interleukin-6-174G>C gene promoter polymorphism and prognosis in patients with cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(27): 44490—7.
12. Brugnara C., Schiller B., Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret-He) and assessment of iron-deficient states. *Clin. Laboratory Hematology*. 2006; 28(5): 303—8.
13. Зубрихина Г.Н., Блиндарь В.Н., Матвеева И.И. Возможности современного автоматизированного клинического анализа крови в дифференциальной диагностике истинного и перераспределительного (функционального) дефицита железа при анемическом синдроме онкологических больных. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 5: 21—5.
14. Sasu B. J., Cooke K. S., Arvedson T. L., Plewa, C., Ellison A. R., Sheng J. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood*. 2010; 115 (17): 3616—24.
15. Рукавицын О.А. Актуальные вопросы диагностики и лечения анемии при хронических заболеваниях. *Онкогематология*. 2012; 5(4): 296—304.
16. Nemeth E., Ganz T. Anemia of Inflammation. *Hematol. Oncol. Clin. North Am*. 2014; Aug; 28(4): 671—68.
17. Saroj Vadhnan-Rajl, Rafat Abonour, Jonathan W. Goldman, David A. Smith, Christopher A. Slapak, Robert L., Ilaria Jr, Ramon V. Tiu, Xuejing Wang, Sophie Callies, Joanne Cox, Jay L. Tuttle, Yiu-Keung Lauand, Eric J. Roeland. A first-in-human phase 1 study of a hepcidin monoclonal antibody, LY2787106, in cancer-associated anemia. *Journal of Hematology Oncology*. 2017; 10: 73.
18. Сахин В.Т., Кремнева Н.В., Гордиенко А.В., Крюков Е.В., Рукавицын О.А. Эритроферрон: современные представления о значении в регуляции обмена железа. *Клиническая онкогематология*. 2017; 10 (1): 25—8.
19. Schrijvers D., de Samblanx H., Roila F. Erythropoiesis-stimulating agents the treatment of anemia in cancer patients: ESMO Clinical Practice for use. *Annals Oncology*. 2010; 21: 244—7.

REFERENCES

1. Ptushkin V.V. Anemia and iron deficiency in cancer patients. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2013; 6 (1): 91—6. (in Russian)
2. Snegovoy A.V., Larionova V.B., Manzyuk L.V., Kononenko I.B. Anemia in oncology: the possibilities of maintenance therapy. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2016; 3(9): 326—35. (in Russian)
3. Barrett-Lee P. J., Ludwig H., Birgegard G., Bokemeyer C., Gascon P., Kosmidis P.A., Krzakowski M., Nortier J.W., Kongable G., Schneider M., Schrijvers D., VanBelle S.J. Independent risk factors for anemia in cancer patients receiving chemotherapy: results from the European Cancer Anemia Survey. *Oncology*. 2006; 70 (1): 34—4.

4. Pigeon C., Igin G., Courselaud. A new mouse liverspecific protein homologous to human antibacterial peptid hepcidin is overexpressed during iron overload. *Journal Biological Chemistry*. 2001; 276: 7811—9.
5. Mazurenko N.N., Kushchinskij N.E. Molecular genetic markers of non-small cell lung cancer. *Molekulyarnaya meditsina*. 2014; 4: 4—13. (in Russian)
6. Pietrangelo A. Hepcidin in human iron disorders; therapeutic implication. *J. hepatology*. 2011; 54(1): 173—81.
7. Blindar V.N., Zubrihina G.N., Matveeva I.I. New concept diagnosis of anemia. *Vestnik RONC im. N.N. Blohina*. 2015—2016; 4-1 (26): 77—85. (in Russian)
8. Nemeth E., Rivera S., Gabajan V. IL6 mediates hypoferremia inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *Journal Clinical Investigation*. 2004;113(9): 1271—6.
9. Alekhnovich L. I. Characterization of biochemical markers of bone tissue metabolism. *Retsept*. 2009; 2: 17—25. (in Russian)
10. Ibricevic-Balic L. Dilemma: Correlation Between Serum Level of Hepsidin and IL-6 Anemic Myeloma Patients. *Med. Arch*. 2016;70 (6): 429—32.
11. Kan Zhai, Yong Yang, Zhi-Gang Gao, Jie Ding. Interleukin-6-174G>C gene promoter polymorphism and prognosis in patients with cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(27): 44490—7.
12. Brugnara C., Schiller B., Moran J. Reticulocyte hemoglobin equivalent (Ret-He) and assessment of iron-deficient states. *Clin. Laboratory Hematology*. 2006; 28(5): 303—8.
13. Zubrihina G.N., Blindar V.N., Matveeva I.I. Possibilities of the modern automated clinical blood test in differential diagnostics of true and redistributive (functional) deficiency of iron at an anemic syndrome of oncologic patients. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 5: 21—5. (in Russian)
14. Sasu B. J., Cooke K. S., Arvedson T. L., Plewa, C., Ellison A. R., Sheng J. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood*. 2010; 115 (17): 3616—24.
15. Rukavitsin O.A. Topical issues of diagnosis and treatment of anemia in chronic diseases. *Onkogematologiya*. 2012; 5(4): 296—304. (in Russian)
16. Nemeth E., Ganz T. Anemia of Inflammation . *Hematol. Oncol.Clin. North Am.* 2014 ; Aug; 28(4): 671—68.
17. Saroj Vadhan-Raj1, Rafat Abonour, Jonathan W. Goldman, David A. Smith, Christopher A. Slapak, Robert L., Ilaria Jr, Ramon V. Tiu, Xuejing Wang, Sophie Callies, Joanne Cox, Jay L. Tuttle, Yiu-Keung Lauand, Eric J. Roeland. A first-in-human phase 1 study of a hepcidin monoclonal antibody, LY2787106, in cancer-associated anemia. *Journal of Hematology Oncology*. 2017;10:73.
18. Sahin V.T., Kremneva N.V., Gordienko A.V., Kryukov E.V., Rukavitsyn O.A . Eritroferon: modern ideas about the value in the regulation of iron metabolism. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2017; 10 (1): 25—8. (in Russian)
19. Schrijvers D., de Samblanx H., Roila F. Erythropoiesis-stimulating agents the treatment of anemia in cancer patients: ESMO Clinical Practice for use. *Annals Oncology*. 2010; 21: 244—7.

Поступила 06.03.19
Принята к печати 11.03.19

ГРУППА КРОВИ КАК ПРЕДИКТОР ГЛИКЕМИИ И ЛАКТАТЕМИИ У ПАЦИЕНТОВ В КРИТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

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

Гиперлактатемия – это опасный для организма метаболический сдвиг, проявляющийся в увеличении содержания лактата крови выше 2,2 ммоль/л. Изменение содержания лактата влияет на функции жизненно важных органов и систем, нарушая течение биохимических процессов. Данное состояние сопровождается большим количеством клинических ситуаций, является утяжеляющим фактором, ухудшая течение болезни и состояние пациента. Изучение особенностей его возникновения и метаболических взаимосвязей помогает дополнить диагностические критерии оценки вероятности неблагоприятного исхода. Цель настоящего исследования – оценить вариабельность содержания лактата и глюкозы, а также соотношения глюкоза/лактат в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0 и нозологии пациентов. Обследованы 250 пациентов с различными нозологиями, состояние которых требовало интенсивной терапии, средний возраст составил 61,08±13,6 лет, и 446 практически здоровых лиц, не имевших острых соматических и инфекционных заболеваний, средний возраст – 26,83±1,46 лет. Исследовали содержание лактата и глюкозы, соотношение глюкоза/лактат, определяли принадлежность крови по системе АВ0. Статистическую обработку результатов проводили в среде IBM SPSS Statistica 23.0. Полученные данные свидетельствуют о том, что пациенты с В (III) группой крови имеют наибольшее содержание лактата в венозной крови по сравнению с генеральной совокупностью, а для пациентов с АВ (IV) группой крови характерен наибольший уровень глюкозы крови. В группе пациентов с наибольшей медианой содержания лактата наблюдалось наименьшее содержание глюкозы. Представленные данные демонстрируют важность измерения и контроля показателей глюкозы, лактата, а также их соотношения при ведении пациентов, находящихся в жизнеугрожающем состоянии. Оценка вариабельности метаболизма в зависимости от разной групповой принадлежности крови по системе АВ0 при критических состояниях, сопровождающихся гиперлактатемией, может служить важным инструментом в моделировании персонализированного подхода к пациенту.

Ключевые слова: лактат; группы крови; гликемия; гиперлактатемия.

Для цитирования: Кузьмичева В.И., Гильмиярова Ф.Н., Колотьева Н.А., Кецко Ю.Л., Гусякова О.А., Кузнецова О.Ю., Горбачева И.В. Группа крови как предиктор гликемии и лактатемии у пациентов в критическом состоянии, Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (4): 216-220. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-216-220>

Kuzmicheva V.I., Gylmiyarova F.N., Koloteva N.A., Ketsko Yu.L., Gusyakova O.A., Kuznetsova O.Yu., Gorbacheva I.V.

BLOOD GROUP AS A PREDICTOR OF GLYCEMIA AND LACTATEMIA IN CRITICAL CONDITION PATIENTS

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

Hyperlactatemia is a dangerous metabolic shift, manifested in an increase in the blood lactate content above 2.2 mmol / l. Changes in the content of lactate affect the function of vital organs and systems, disrupting the course of biochemical processes. This condition accompanies a large number of clinical situations, also it is a major factor, worsening the clinical outcome and the patient's condition. The study of the characteristics of its occurrence and metabolic relationships helps to fulfill the diagnostic criteria for assessing the likelihood of an adverse outcome. The purpose of this study is to assess the variability of the content of lactate and glucose, as well as the glucose/lactate ratio, depending on the group of blood in the ABO system and the nosology of patients. 250 patients with various diseases whose condition required intensive care were examined, the middle age was 61.08 ± 13.6 years, and 446 practically healthy individuals who did not have acute somatic and infectious diseases, the middle age was 26.83 ± 1.46 years. We investigated the content of lactate and glucose, the glucose/lactate ratio, determined the belonging of the blood to ABO system. Statistical processing of the results was performed in the IBM SPSS Statistica 23.0. The data obtained indicate that patients with B (III) blood group have the highest lactate content in venous blood compared to the general population, and patients with AB (IV) blood group have the highest blood glucose level. In the group of patients with the highest median lactate content, the lowest glucose content was observed. The data presented demonstrate the importance of measuring and monitoring glucose, lactate, and their ratio in the management of patients in a life-threatening condition. Evaluation of metabolic variability depending on the different blood grouping of the ABO system in critical conditions involving hyperlactataemia can serve as an important tool in modeling a personalized approach to the patient.

Key words: lactate; blood group; glycemia; hyperlactatemia.

For citation: Kuzmicheva V.I., Gylmiyarova F.N., Koloteva N.A., Ketsko Yu.L., Gusyakova O.A., Kuznetsova O.Yu., Gorbacheva I.V. Blood group as a predictor of glycemia and lactatemia in critical condition patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (4): 216-220 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-216-220>

For correspondence: Kuzmicheva V.I., resident, department of fundamental and clinical biochemistry; bio-sam@yandex.ru

Information about authors:

Kuzmicheva V.I., <https://orcid.org/0000-0002-5232-1549>

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

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

Gorbacheva I.V. <https://orcid.org/0000-0002-8267-9250>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Kolotyeva N.A., <https://orcid.org/0000-0002-7583-6222>

Ketsko Y.L., <http://orcid.org/0000-0002-2749-8692>

Kuznetsova O.Y., <https://orcid.org/0000-0002-3509-5965>

Received 13.02.2019

Accepted 20.03.2019

Введение. Увеличение уровня лактата в крови во время различных патологических состояний впервые заметили еще в 1800-е годы, когда Schreger измерил содержание лактата посмертно у женщины с родильной горячкой. В 1858 г. Folwarcny описал увеличенное содержание лактата прижизненно у пациентов с лейкемией, а в 1878 г. Salomon - у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, пневмонией, опухолями и сердечной недостаточностью. В последующие годы продолжались эксперименты по изучению роли лактата в различных тканях, а также взаимоотношений других метаболитов с лактатом при физиологических и патологических состояниях [1,2].

Гиперлактатемия представляет собой патологическое состояние, при котором отмечается увеличение содержания лактата крови выше 2,2 ммоль/л [3]. По причине возникновения данного состояния выделяют несколько классов: гиперлактатемия типа А ассоциирована с недостаточной перфузией органов и тканей кислородом (кардиогенный шок, анемия, сепсис.), типа В, имеющая под собой основу в виде заболевания (сахарный диабет и др.), применения некоторых лекарственных средств (морфин, инсулин и др.) или проявляется вследствие болезни метаболизма (MELAS синдром и др.) [4-8]. Вне зависимости от причины, увеличенное содержание лактата в крови – это повод для тщательного наблюдения пациента и применения экстренных мер по коррекции метаболических нарушений, вызванных избытком данного интермедиата. Сохраняющаяся более 5 ч высокая гиперлактатемия (>5 ммоль/л) является фактором, значительно повышающим возможность неблагоприятного исхода [9-14].

Цель данного исследования: оценить вариабельность содержания лактата и глюкозы в крови в зависимости от групповой принадлежности по системе АВ0 и нозологии у пациентов в критическом состоянии.

Материал и методы. Под наблюдением находилось две группы лиц, первая из которых состояла из 250 пациентов с различными нозологиями, находившихся в отделении интенсивной терапии и реанимации ФГБОУ ВО Клиник СамГМУ в период с 01 января 2017 г. по 31 декабря 2017 г., средний возраст составил $61,08 \pm 13,6$ лет, женщин среди них было 54,98%, мужчин – 45,02%. Группа сравнения состояла из 446 практически здоровых человек, состояние которых подтверждалось отсутствием обострения хронических соматических заболеваний, а также социально значимых бактериальных и вирусных инфекций, женщин среди них - 68,16%, мужчин – 31,84%, средний возраст – $26,83 \pm 1,46$ лет.

Материалом для исследования являлась венозная кровь, полученная путем венепункции локтевой вены, собранная в пробирки для взятия крови фирмы «VACUTAINER» (США). В качестве консерванта при определении содержания глюкозы и лактата использовали пробирки, содержащие фторид натрия и оксалат. Сыворотку крови получали путем центрифугирования в течении 5 мин, 1700 g. Для определения групп крови использовали пробирки, содержащие ЭДТА в качестве консерванта. Содержание лактата в плазме крови определяли энзиматическим колориметрическим методом. Принцип метода основан на окислении лактата до пирувата под действием фермента лактатоксидазы, в качестве побочного продукта реакции образуется пероксид водорода. Пероксид водорода в присутствии хромогенного вещества под действием фермента пероксидазы об-

разует окрашенный комплекс. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию лактата. Изменения регистрировали при 552 нм.

Содержание глюкозы определяли гексокиназным методом. Принцип метода заключается во взаимодействии глюкозы с АТФ под действием фермента гексокиназы с образованием глюкозо-6-фосфата. Затем, глюкозо-6-фосфат при взаимодействии с НАД+ под действием фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы переходит в 6-фосфоглюконат, а также образуется НАДН, Н+. Концентрация образованного НАДН прямо пропорциональна концентрации глюкозы. Пик абсорбции регистрировали при 340 нм. Исследования проводились на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas Integra 400 plus (Roche-Diagnostics, Германия) с использованием реактивов Roche-Diagnostics (Германия).

Определение групп крови по системе АВ0 проводили с использованием «ЭРИТРОТЕСТ» - цоликлонов анти-А, анти-В диагностических жидких методом прямой агглютинации на плоскости. Агглютинацию оценивали по балльной шкале (pt) W.L.Marsh.

Распределение по группам крови в названных группах оказалось следующим: в опытной группе наблюдаемых – 0 (I) – 34%, А(II)- 36,5%, В (III) -20%, АВ (IV) – 10%; в контрольной группе клинически здоровых лиц – 0 (I) – 29,6%, А (II) – 31,8%, В (III) – 24,3%, АВ (IV) –14,3%

Статистический анализ полученных данных проводился в пакете прикладных программ IBM SPSS Statistics 23. Изучаемые признаки (уровень глюкозы, лактата, а также соотношение глюкоза/лактат) в исследуемых группах имели распределение, отличное от нормального. Нормальность распределения оценивалась с использованием теста Колмогорова-Смирнова. Для описания полученных величин использовали медиану (Me), 95% доверительный интервал для медианы (95% CI), первый и третий квартили (Q1-Q3), минимальное и максимальное значения. Межгрупповые сравнения проводились с использованием теста Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Наивысшие средние показатели содержания лактата отмечаются у лиц с В (III) группой крови как в 1-й - $3,09 \pm 1,28$ ммоль/л, так и во 2-й группах - $2,27 \pm 0,14$ ммоль/л. Наименьшие средние показатели лактата характерны для лиц с АВ (IV) группой крови - $2,19 \pm 0,22$ ммоль/л среди пациентов, требующих интенсивной терапии и $2,01 \pm 0,18$ ммоль/л в группе сравнения соответственно. Однако, наибольшая медиана в 1-й группе пациентов встречается у лиц с А (II) группой крови и составляет $5,24$ ммоль/л, в группе сравнения наибольшая медиана была отмечена у лиц с В (III) группой крови - $2,29$ ммоль/л. Обращает на себя внимание, что минимальные значения содержания лактата в группе сравнения ниже, чем в исследуемой группе, на 20% (табл. 1).

Максимальное значение лактата крови в исследуемой группе составило $24,24$ ммоль/л и было зарегистрировано у пациентов с АВ(IV) группой крови, минимальное значение составило $0,55$ ммоль/л и было выявлено также в группе пациентов с АВ (IV) группой крови. Медианы содержания лактата в группе сравнения распределились следующим образом: АВ (IV) – $1,25$ ммоль/л, 0 (I) – $2,49$ ммоль/л, В (III) – $3,075$ ммоль/л, А (II) – $5,24$ ммоль/л.

Далее мы оценивали содержание глюкозы в сыворотке крови у пациентов 1-й и 2-й групп. Данные метаболиты – лактат и глюкоза – были выбраны нами для

Таблица 1
Содержание лактата в плазме крови у пациентов, требующих интенсивной терапии и в группе сравнения в зависимости от принадлежности крови по системе АВ0 (ммоль/л)

Группы обследуемых	Медиана (Q1-Q3)	95% CI	Критерий Манна-Уитни, <i>p</i>	Минимум	Максимум
0(I)	1 2,49 (1,74-3,87) 2 2,10 (1,73-2,44)	1,72-2,50 1,54-2,38	0,419	0,82 1,14	22,24 4,65
A (II)	1 5,24 (2,11- 4,435) 2 1,04 (1,45-2,42)	2,49-3,28 1,53-2,04	0,0001	0,58 1,04	17,54 4,16
B (III)	1 3,075 (2,33- 4,37) 2 2,29 (1,67-2,94)	2,51-3,78 1,87-2,47	0,0016	0,74 1,09	25,43 4,28
AB (IV)	1 1,25 (1,5- 2,71) 2 1,85 (1,54-2,50)	1,72-2,51 1,54-2,38	0,419	0,55 0,86	24,24 4,01

Таблица 2
Содержание глюкозы в крови в исследуемой группе и группе сравнения с 0(I)- АВ(IV) группами крови (ммоль/л)

Группы обследуемых	Медиана (Q1-Q3)	95% CI	Критерий Манна-Уитни, <i>p</i>	Минимум	Максимум
0(I)	1 9,02 (6,91- 11,99) 2 4,21 (4,07-4,55)	8,33-10,23 4,09-4,43	0,0001	3,69 3,40	21,58 5,32
A (II)	1 3,135 (6,73-11,8) 2 4,30 (4,00-4,66)	8,39-10,22 4,15-4,51	0,0001	1,38 3,40	24,49 7,15
B (III)	1 12,77 (6,89-10,17) 2 4,31 (4,19-4,49)	7,09-9,59 4,20-4,50	0,0001	3,22 3,70	17,01 4,99
AB (IV)	1 7,97 (6,86-12,36) 2 4,50 (4,29-5,48)	7,45-12,21 4,25-5,11	0,0001	3,26 3,39	38 5,77

детального анализа и сравнения не случайно, они отражают состояние углеводного обмена и проявляют вариативность в зависимости от групповой принадлежности крови по системе АВ0 [15] (табл. 2).

Максимальное среднее содержание глюкозы как в группе пациентов, требующих интенсивной терапии, так и в группе клинически здоровых лиц, наблюдалось у пациентов с АВ (IV) группой крови и составило $4,66 \pm 0,17$ ммоль/л и $10,01 \pm 2,09$ ммоль/л соответственно. Отметим, что наивысшая медиана встречалась у лиц с В (III) группой крови - 3,7 ммоль/л в группе сравнения и 12,77 ммоль/л среди пациентов реанимационного отделения. Минимальные значения регистрировались у пациентов с А (II) группой крови - 1,38 ммоль/л в исследуемой группе и у лиц с АВ (IV) группой крови - 3,39 ммоль/л в группе сравнения.

Распределение медиан в группе пациентов, требующих интенсивной терапии, представляется следующим образом: А(II) - 3,13 ммоль/л, АВ (IV) - 7,97 ммоль/л, 0 (I) - 9,02 ммоль/л, В (III) - 12,77 ммоль/л.

Нами было подсчитано соотношение глюкоза/лактат для пациентов реанимационного отделения и пациентов группы сравнения (табл. 3). Обращает на себя внимание медиана, полученная для лиц с А (II) группой крови в исследуемой группе - 0,33. Для пациентов с этой группой крови характерной была наибольшая медиана содержания лактата (5,24 ммоль/л) и наименьшая - глюкозы (3,13 ммоль/л). В целом, медианы соотношения глюкоза/лактат в исследуемой группе распределились следующим образом: АВ (IV) - 0,17, 0 (I) - 0,28, В (III) - 0,3, А (II) - 2,84. Наименьший коэффициент характерен для АВ (IV) группы, у пациентов этой группы наблюдалось максимальное значение среднего содержания глюкозы

($10,01 \pm 2,09$ ммоль/л) и наименьшее - лактата ($2,19 \pm 0,22$ ммоль/л) (см. рисунок).

Пониженное содержание глюкозы вместе с повышенным содержанием лактата может быть объяснено с использованием эффекта «лактат-протективная гипогликемия» [16]. В эксперименте, проведенном научной группой М. Goodwin, было показано, что выживаемость выше в той группе, где низкие уровни глюкозы сопровождалась высоким уровнем лактата, по сравнению с группой, где и лактат, и глюкоза имели низкое содержание. По данным этих исследований, в условиях стрессовых ситуаций и недостатка привычного топлива головной мозг может около 5 часов использовать преимущественно лактат в качестве альтернативного источника энергии.

Пациенты нашего исследования, находившиеся в отделении реанимации, были разделены на группы в зависимости от нозологии и групповой принадлежности крови по АВ0 системе (табл. 4).

Сердечно-сосудистые и нефрологические заболевания наиболее часто встречались среди пациентов с А (II) группой крови, а заболевания

желудочно-кишечного тракта доминировали в группе больных с 0 (I) группой крови. Гематологические и эндокринологические заболевания встречались с одинаковой частотой у пациентов с 0 (I) и А (II) группами крови. Пациенты с АВ (IV) группой крови имели наименьшее количество случаев заболевания в каждой группе нозологии.

Z. Chen и соавт. [17] также пришли к заключению, что риск развития коронарных заболеваний и развития сердечно-сосудистых осложнений выше у пациентов с А (II) группой крови. Проведенное исследование включало анализ 17 работ и 225810 пациентов.

Что касается заболеваний органов желудочно-кишечного тракта, то отмечено, что пациенты, не имеющие на поверхности эритроцитов антигенных детерминант А и В, были гораздо чаще подвержены развитию онкологических процессов и имели более низкую выживаемость [18].

Исследуемая группа была разделена по степени увеличения содержания лактата в крови на три подгруппы: пациенты с нормальным содержанием лактата (до 2 ммоль/л), пациенты с умеренным повышением лактата (2-4,9 ммоль/л) и пациенты с высоким содержанием лактата (≥ 5 ммоль/л). Наибольшее число пациентов, как среди мужчин (54%), так и среди женщин (57%), имело содержание лактата венозной крови от 2 до 4,9 ммоль/л. Содержание лактата, превышающее 5 ммоль/л, было характерно для 18% мужчин и для 10% женщин.

Далее мы оценили, как изменяется содержание лактата в зависимости от различных нозологий (табл. 5).

Отметим, что наибольшая группа пациентов, имевших повышение лактата свыше 5 ммоль/л, имели заболевания органов желудочно-кишечного тракта. Интерес-

Таблица 3

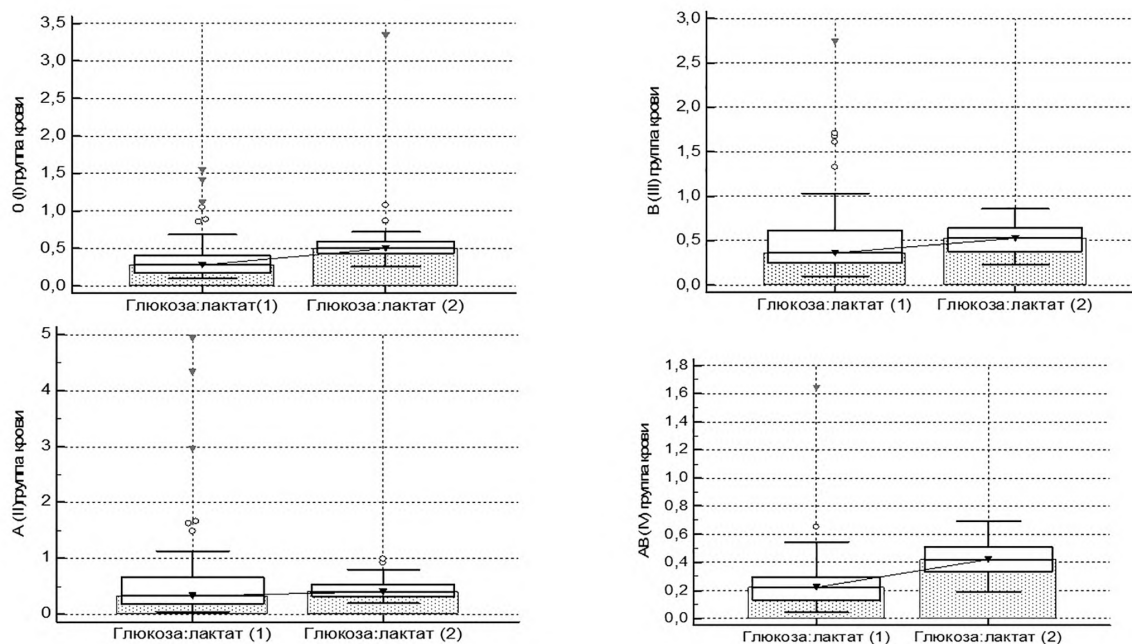
Соотношение глюкоза/лактат в исследуемой группе и группе сравнения в зависимости от принадлежности крови по системе АВО

Группы крови	Группы обследуемых	Медиана (Q1-Q3)	95% CI	Критерий Манна-Уитни, <i>p</i>	Минимум	Максимум
0(I)	1	0,28 (0,18-0,4)	0,14-0,28	0,0006	0,09	1,54
	2	0,42 (0,33-0,51)	0,34-0,51			
A (II)	1	0,33 (0,17-0,65)	0,28-0,40	0,070	0,04	4,93
	2	0,4 (0,31-0,53)	0,35-0,45			
B (III)	1	0,3 (0,26-0,6)	0,30-0,47	0,048	0,11	2,73
	2	0,53 (0,37-0,64)	0,38-0,55			
AB (IV)	1	0,17 (0,12-0,29)	0,14-0,28	0,0006	0,04	1,64
	2	0,42 (0,33-0,50)	0,34-0,49			

Таблица 4

Распределение заболеваний среди пациентов, требующих интенсивной терапии, в зависимости от принадлежности крови по системе АВО (количество случаев)

	0 (I)	A (II)	B (III)	AB (IV)
Сердечно-сосудистые заболевания	25	36	12	10
Заболевания ЦНС	4	0	4	0
Заболевания желудочно-кишечного тракта	33	26	21	6
Эндокринопатии	2	2	0	0
Гематологические заболевания	5	5		4
Нефрологические заболевания	11	16	5	2
Другое	5	6	7	3



Соотношение глюкоза/лактат в исследуемой группе и группе сравнения.

но, что наивысшее количество пациентов с нормальным содержанием лактата также характерно для заболеваний пищеварительной системы. Для пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы характерно увеличение содержания лактата выше референсных значений в 53% случаев, однако, критическое увеличение лактата в рамках данной нозологии встречается только в 9% клинических ситуаций. Для больных гематологического профиля наблюдали увеличение лактата до 4,9 ммоль/л в

56% наблюдений, а увеличение свыше 5 ммоль/л - в 28% случаев. Пациенты с нефрологическими заболеваниями в 39% случаев имели нормальное значение содержания лактата, а пациенты эндокринологического профиля - в 67% случаев.

Принято считать, что уровень лактата свидетельствует о недостаточной перфузии тканей кислородом, что, однако, не всегда соответствует действительности. Так, например, при патологии сердечно-сосудистой системы гиперлакта-

Содержание лактата (ммоль/л) у лиц исследуемой группы в зависимости от нозологии

Заболевания	<2 ммоль/л		2-4.9 ммоль/л		≥5 ммоль/л		Итого	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Центральной нервной системы	2	17%	6	50%	4	33%	12	100%
Сердечно-сосудистой системы	23	26%	58	65%	8	9%	89	100%
Органов желудочно-кишечного тракта	30	27%	59	53%	22	20%	111	100%
Эндокринопатии	4	67%	2	33%	0	0%	6	100%
Гематологические	3	17%	10	56%	5	28%	18	100%
Нефрологические	15	39%	17	45%	6	16%	38	100%
Другое	8	33%	12	50%	4	17%	24	100%

темия может иметь и гипоксическое, и негипоксическое происхождение. Также повышенный уровень лактата может возникать и у пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких. Основным источником лактата во время стрессовых состояний являются скелетные мышцы, уровень метаболизма в которых, как подтверждено исследованиями, не приводит к гипоксическим сдвигам. Более того, введение дихлорацетата — активатора пируватдегидрогеназы — уменьшает содержание лактата [19]. Одним из возможных объяснений негипоксической природы гиперлактатемии при патологии сердца и сосудов является акселерация гликолиза, усиление потребления глюкозы периферическими тканями и органами, что ведет к избыточному накоплению пирувата и его трансформации в лактат. Более того, увеличенная продукция пирувата ведет к более активному его вступлению в цикл трикарбоновых кислот [20]. Следовательно, вместо представления об активации анаэробных процессов, напротив, мы видим усиленный аэробный обмен у таких пациентов.

Заключение. Таким образом, гиперлактатемия является важным фактором, способным усугублять течение основного заболевания, что подчеркивает роль лактата как одного из основных метаболитов организма человека, нарушение гомеостаза которого отражается на благополучии всего организма. Вариации содержания лактата и глюкозы в зависимости от принадлежности крови по системе АВО могут влиять на интерпретацию результатов исследования, а значит, и тактику ведения пациентов, находящихся в неотложном состоянии. Подсчет соотношения глюкоза/лактат может стать рутинным методом и служить индикатором обеспеченности головного мозга энергетическими субстратами.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kompanje E.J., Jansen T.C., van der Hoven B. The first demonstration of lactic acid in human blood in shock by Johann Joseph Scherer (1814–1869) in January 1843. *Intensive Care Medicine*. 2007; 33(11):1967-71.
- Mizock B.A. Hyperlactatemia in acute liver failure: decreased clearance versus increased production. *Critical Care Medicine*. 2001; 29(11): 2225-6.
- Morris E., McCartney D., Lasserson D., Van den Bruel A., Fisher R., Hayward G. Point-of-care lactate testing for sepsis at presentation to health care: a systematic review of patient outcomes. *British Journal of General Practice*. 2017; 67(665):e859-e870.
- Vincent J.L., Quintairos E., Silva A., Couto L., Taccone F.S. The value of blood lactate kinetics in critically ill patients: a systematic review. *Critical Care*. 2016; 20(1): 257.
- Kraut J.A., Madias N.E. Lactic acidosis. *The New England Journal of Medicine*. 2014; 371: 2309-19.
- Andersen L.W., Mackenhauer J., Roberts J.C., Berg K.M., Cocchi M.N., Donnino M.W. Etiology and therapeutic approach to elevated lactate levels. *Mayo Clinic Proceedings*. 2013; 88(10):1127-40.
- Kubiak G.M., Tomasik A.R., Bartus K., Olszanecki R., Ceranowicz P. Lactate in cardiogenic shock - current understanding and clinical implications. *Journal of physiology and pharmacology*. 2018;69(1):15-21.
- Murakami H., Ono K. MELAS: Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-Like Episodes. *Brain and Nerves*. 2017; 69(2):111-7.
- Vernon C., Letourneau J.L. Lactic acidosis: recognition, kinetics, and associated prognosis. *Critical care clinics*. 2010; 26(2):225-83.
- Goodwin M.L., Gladden L.B., Nijsten M.W., Jones K.B. Lactate and Cancer: Revisiting the Warburg Effect in an Era of Lactate Shuttling. *Frontiers in nutrition*. 2015;1: 27.
- Mikkelsen M.E., Miltiades A.N., Gaieski D.F., et al. Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. *Critical Care Medicine*. 2009; 37(5):1670-7.
- Shapiro N.I., Fisher C., Donnino M., et al. The feasibility and accuracy of point-of-care lactate measurement in emergency department patients with suspected infection. *Journal of Emergency Medicine*. 2010; 39(1): 89-94.
- Haas S.A., Lange T., Saugel B., Petzoldt M., Fuhrmann V., Metschke M. et al. Severe hyperlactatemia, lactate clearance and mortality in unselected critically ill patients. *Intensive Care Medicine*. 2016; 42: 202-10.
- Wang H., Wu D.W., Chen X.M., Li C., Ding S.F., Zhai Q., et al. Relationship between blood lactic level, lactic clearance, duration of lacticemia and prognosis of critically ill patients in intensive care unit. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2009;21:357-60.
- Nichol A., Bailey M., Egi M., Pettila V., French C., Stachowski E. et al. Dynamic lactate indices as predictors of outcome in critically ill patients. *Critical Care*. 2011;15: R242.
- Revelly J.P., Tappy L., Martinez A., Bollmann M., Cayeux M.C., Berger M.M., et al. Lactate and glucose metabolism in severe sepsis and cardiogenic shock. *Critical Care Medicine*. 2005;33:2235-40.
- Chen Z., Yang S. H., Xu H., Li J. J. ABO blood group system and the coronary artery disease: an updated systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*. 2016; 6: 23250.
- Xu Y.Q., Jiang T.W., Cui Y.H., Zhao Y.L., Qiu L.Q. Prognostic value of ABO blood group in patients with gastric cancer. *Journal of Surgical Research*. 2016; 201(1):188-95
- Gore D.C., Jahoor F., Hibbert J.M., DeMaria E.J. Lactic acidosis during sepsis is related to increased pyruvate production, not deficits in tissue oxygen availability. *Annals Surgery*. 1996; 224: 97-102.
- Minton J., Sidebotham D. A. Hyperlactatemia and Cardiac Surgery. *The journal of extra-corporeal technology*. 2017; 49(1): 7-15.

Поступила 13.02.19

Принята к печати 20.03.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Йовдий А.В., Бутина Е.В., Попонина Е.А., Зайцева Г.А., Минаева Н.В.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ У ПАЦИЕНТОВ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ КЛИНИКИ

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

Точность определения групп крови реципиента и донора имеет первостепенное значение для подбора трансфузионных сред. Трудности в интерпретации результатов иммуногематологических тестов установлены у 18,0% первичных гематологических больных. Наиболее часто выявлялись двойная популяция эритроцитов при определении антигенов системы Резус (10,9%), ауто- (3,9%) и аллоантитела (2,8%). Предложенный алгоритм выбора донорских эритроцитов в сложных диагностических случаях позволяет предупреждать развитие посттрансфузионных осложнений.

Ключевые слова: эритроциты; группа крови; антигены; антитела; системы АВ0; резус; Келл; трансфузионная терапия.

Для цитирования: Йовдий А.В., Бутина Е.В., Попонина Е.А., Зайцева Г.А., Минаева Н.В. Интерпретация результатов иммуногематологических исследований у пациентов гематологической клиники. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (4): 221-224. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-221-224>

Yovdiy A.V., Butina E.V., Poponina E.A., Zaitseva G.A., Minaeva N.V.

INTERPRETATION OF THE RESULTS OF IMMUNOHEMATOLOGICAL TESTS IN HEMATOLOGICAL PATIENTS

Federal State Budget Institution of Science "Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical-Biological Agency", 610027 Kirov, Russian Federation

The correct determination of the blood types of the recipient and the donor is very important for the choice of blood components for transfusion. As a result of the study, it was established that 18.0% of patients, admitted to the hematology clinic, have difficulties in interpreting of the results of immunohematological tests. Most often, a double population of red blood cells was detected when determining antigens of the Rhesus system (10.9%), auto- (3.9%) and alloantibodies (2.8%). The proposed algorithm for the selection of donor red blood cells in difficult diagnostic cases helps to prevent the development of post-transfusion complications.

Key words: red blood cells; blood type; antigens; antibodies; АВ0 systems; rhesus; Kell; transfusion therapy.

For citation: Yovdiy A.V., Butina E.V., Poponina E.A., Zaitseva G.A., Minaeva N.V. Interpretation of the results of immunohematological tests in hematological patients. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64(4): 221-224. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-221-224>

For correspondence: Yovdiy A.V.; e-mail: annaovdii@bk.ru

Information about authors:

Yovdiy A.V., <https://orcid.org/0000-0003-2496-0308>

Butina E.V., <https://orcid.org/0000-0003-2496-0308>

Poponina E.A., <https://orcid.org/0000-0003-4941-1735>

Zaitseva G.A., <https://orcid.org/0000-0002-3404-6512>

Minaeva N.V., <https://orcid.org/0000-0003-2496-0308>

Acknowledgment. This work was supported by the RFFI grant No. 18-04-00162A.

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

Received 20.03.2019

Accepted 23.03.2019

Введение. Точность определения групповой принадлежности крови донора и реципиента имеет первостепенное клиническое значение для предотвращения посттрансфузионных осложнений гемолитического типа [1]. Ошибки при учете образцов крови и регистрации результатов являются одной из основных причин неправильного определения группы крови [2, 3]. Внедрение методов стандартизации операционных процедур и автоматизации направлено на предупреждение технических лабораторных ошибок. На результаты исследований влияют также биологические факторы, к которым относятся врожденные индивидуальные особен-

ности человека (количество антигенных детерминант на эритроците) и модификация антигенов под действием внешних условий, в том числе при развитии онкологических и гематологических заболеваний [1, 2, 4–6]. Наличие в крови реципиентов антител или перелитых донорских эритроцитов (посттрансфузионный химеризм) усложняет интерпретацию иммуногематологических тестов [7–12].

Цель работы – разработать алгоритм подбора эритроцитов для трансфузий пациентам в сложных случаях иммуногематологической диагностики.

Материал и методы. В исследование включены 466 больных, впервые поступивших в клинику института в 2017–2018 г. с диагнозами: множественная миелома (73), неходжкинская лимфома (68), патология гемостаза (66), острый лимфобластный лейкоз (49), лимфома Ход-

Для корреспонденции: Йовдий Анна Васильевна, канд. мед. наук, мл. науч. сотр. лаб. иммуногематологии; e-mail: annaovdii@bk.ru

жжина (40), острый миелобластный лейкоз (39), анемии различного генеза (39), хронический лимфолейкоз (29), хронический миелолейкоз (15), миелодиспластический синдром (11), другие гематологические заболевания (37). Типирование антигенов систем АВ0, Резус, Келл, скрининг и идентификация антител проведены с использованием оборудования и реактивов фирмы Bio Rad (США).

Результаты. Сложности интерпретации результатов иммуногематологических исследований наблюдались у 84 (18,0%) пациентов. При этом у больных выявлялись проблемы диагностики как в одном лабораторном тесте, так и в нескольких. Структура сложнodiагностируемых случаев представлена в табл. 1.

Одним из самых сложных случаев для диагностики является невозможность интерпретации результатов исследования АВ0-принадлежности вследствие искажения экспрессии А и В антигенов, снижения выработки естественных анти-А, -В антител у гематологических больных, итогом трансфузий АВ0-неидентичных эритроцитов (химера по АВ0 антигенам) или панагглютинации эритроцитов, обусловленной действием аутоантител. Так, у пациента Г., 57 лет, с диагнозом «хронический лимфолейкоз» при определении группы крови системы АВ0 наблюдалась агглютинация эритроцитов с анти-А, анти-В моноклональными антителами (МА). В плазме

присутствовали анти-В, но отсутствовали анти-А естественные антитела. Аутоконтроль был положительным (рис. 1).

Иммуногематологическое заключение: «Неинтерпретируемая АВ0- и резус- принадлежность крови. Панагглютинация эритроцитов». Дифференцированная прямая проба Кумбса выявила на эритроцитах адсорбированные иммуноглобулины IgG (++) , IgM (+) и компонент комплемента С3d (+++). Диагностированы лабораторные признаки гемолитической анемии: гемоглобин 49 г/л, общий билирубин 51,3 мкмоль/л, не прямой билирубин 40,1 мкмоль/л (норма 0-13,7 мкмоль/л), ретикулоциты 58% (норма 2-12%). Пациент получал химиотерапию и гемотрансфузионную поддержку отмытыми эритроцитами 0(I) резус-отрицательными. Повторное иммуногематологическое исследование проведено через месяц (рис. 2). В микропробирке с МА анти-А определялась двойная популяция эритроцитов – экспрессирующих и не экспрессирующих антиген А; в пробирке с МА анти-В – наблюдалась положительная реакция на (+).

При обследовании больного в состоянии ремиссии основного заболевания спустя 6 месяцев после трансфузии эритроцитов установлена А(II) резус-положительная группа крови (рис. 3).

В некоторых случаях, при положительном аутоконтроле, интерпретировать иммуногематологические ис-

Таблица 1

Структура сложнodiагностируемых случаев

Проблема иммуногематологической диагностики	Количество сложнodiагностируемых случаев, абс.	Процент от числа сложнodiагностируемых случаев (n=96)	Процент от общего числа больных (n=466)
Неинтерпретируемая АВ0- и резус – принадлежность (положительный аутоконтроль)	3	3,1	0,6
Химера по антигенам системы АВ0	3	3,1	0,6
Химера по антигену D	3	3,1	0,6
Несоответствие прямого и обратного определения группы крови системы АВ0	5	5,2	1,1
Химера по антигенам системы Резус	51	53,1	10,9
Выявление аутоантител	18	18,8	3,9
Выявление специфических аллоантител	7	7,3	1,5
Выявление антител неустановленной специфичности	2	2,1	0,4
Выявление полиспецифических аллоантител	4	4,2	0,9

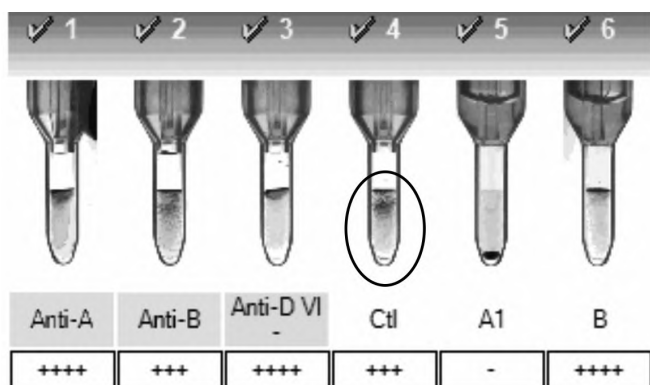


Рис. 1. Группа крови больного Г. по системе АВ0.

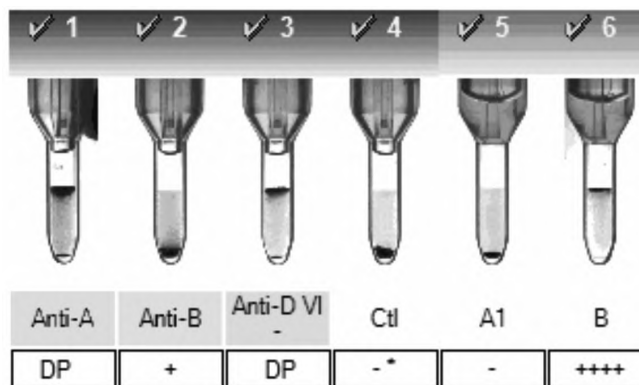


Рис. 2. Группа крови больного Г. по системе АВ0 при повторном исследовании через 1 мес.

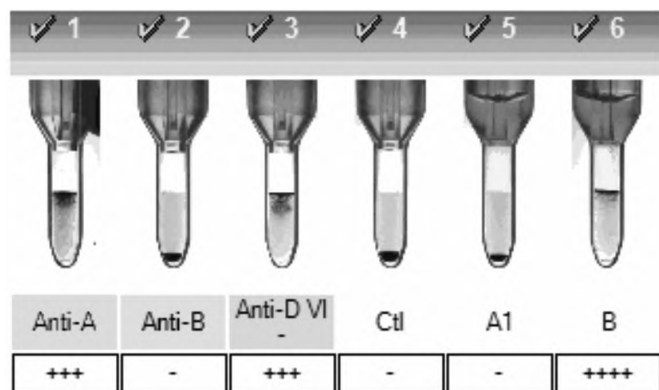


Рис. 3. Группа крови больного Г. по системе АВ0 при исследовании через 6 мес.

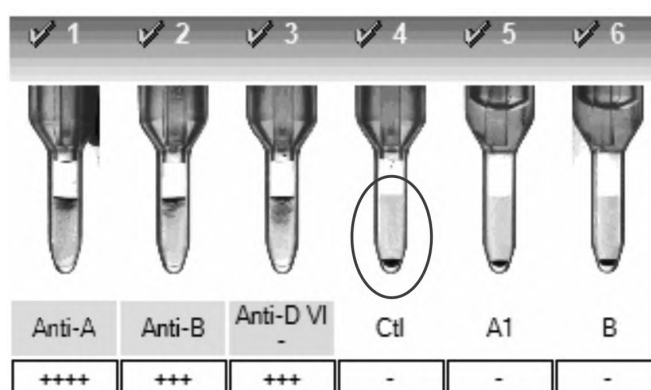


Рис. 5. Результаты лабораторных данных больной А. после отмывания эритроцитов.

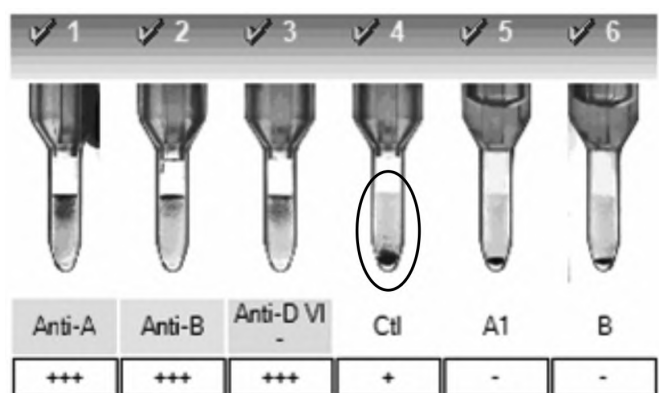


Рис. 4. Результаты лабораторных данных больной А. при первичном исследовании.

следования становится возможным после отмывания исследуемых эритроцитов. Так, у больной А., 58 лет, с диагнозом «неходжкинская лимфома» при определении группы крови по системе АВ0 и резус-принадлежности наблюдалась агглютинация эритроцитов в контрольной пробирке (рис. 4). После трехкратного отмывания эритроцитов физиологическим раствором при повторном исследовании установлена АВ (IV) группа крови, резус – положительная (рис. 5).

Наличие двойной популяции эритроцитов по антигенам системы Резус являлось наиболее частой проблемой для интерпретации результатов, встречающейся у 10,9% пациентов. Химеризм по одному антигену системы Резус обнаружен у 24 больных, по двум – у 17, по трем – у 6, по четырем – у 2. Химера по антигену Е наблюдалась в 31 случае (60,8% пациентов с химерой по антигенам Резус и Келл), С – в 23 (45,1%), с – в 15 (29,4%), е – в 5 (9,8%), Сw – в 8 (15,7%), К – в 5 (9,8%). Так, у пациента К., 55 лет, поступившего в клинику с диагнозом «хронический лимфолейкоз С стадия», установлена АВ0 принадлежность эритроцитов – 0(I), резус – положительный, резус-фенотип: С(химера)с Е(химера)е. Прямая проба Кумбса отрицательная. Трансфузионная поддержка осуществлялась эритроцитами с фенотипами 0(I) ccDee и 0(I) ccdee. Больной повторно госпитализирован через 5 мес, в течение которых получал трансфузии эритроцитсодержащих компонентов крови (ЭСК) 0(I) ccdee в стационаре по месту жительства. Результаты иммуногематологических исследований свидетельствовали об отсутствии собственных эритроцитов пациента вследствие тотальной депрессии костномозгового кроветворения. Наблюдался 100% посттрансфузионный донорский химеризм.

Аллоантитела выявлены у 2,8% пациентов, в том числе специфические анти – D – у 4 (0,86%), анти – DC – у 2 (0,43%), анти – К – у 1 (0,21%); антитела неустановленной специфичности – у 2 (0,43%), полиспецифические

Таблица 2

Алгоритм подбора эритроцитов для трансфузий пациентам в сложных диагностических случаях

Результаты иммуногематологического исследования у пациента	Эритроцитсодержащие компоненты крови, рекомендованные для трансфузий
Неинтерпретируемая АВ0-принадлежность	0(I) отмывтые, совместимые с реципиентом по антигенам систем Резус и Келл
Несоответствие прямого и обратного тестов определения группы крови АВ0	0(I) отмывтые, совместимые с реципиентом по антигенам систем Резус и Келл
Неинтерпретируемая резус (D)-принадлежность	АВ0- идентичные резус (D)- отрицательные
Химера по антигенам системы АВ0	Отмывтые эритроциты, не несущие химерный антиген, совместимые по второму антигену системы АВ0
Химера по антигенам системы Резус	Эритроциты, не несущие химерный антиген. При наличии химеры в обоих парных антигенах – трансфузии эритроцитов с фенотипом CC и/или ee
Выявлены аутоантитела	Эритроциты, совместимые по системам АВ0, Резус и Келл
Выявлены аллоантитела	Проведение предтрансфузионного подбора эритроцитов в непрямой пробе Кумбса в условиях лаборатории

– у 4 (0,86%). В отличие от женщин, у мужчин антиэритроцитарные антитела в большинстве случаев являются следствием трансфузионной терапии. Так, у пациента С., 44 лет, впервые госпитализированного в клинику института с диагнозом «гемофилия А», определены анти-К антитела. Как известно, трансфузии эритроцитов без учета антигена-К на территории Российской Федерации запрещены в течение последних двадцати лет. Вероятно, иммунизация больного произошла до запрета выдачи в лечебно-профилактические учреждения К- положительных ЭСК.

В нашем институте разработан алгоритм подбора эритроцитов для реципиентов в сложных диагностических случаях (табл. 2).

Заключение. Правильность определения групп крови реципиента и донора имеет первостепенное значение для подбора трансфузионных сред. Трудности в интерпретации результатов иммуногематологических тестов установлены у 18,0% первичных больных гематологического стационара. Чаще всего выявлялись двойная популяция эритроцитов при определении антигенов системы Резус, а также алло- и аутоантитела. Предложенный алгоритм выбора ЭСК в сложных диагностических случаях помогает предупреждать развитие посттрансфузионных осложнений.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №18-04-00162А.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-5, 9-11 см. REFERENCES)

1. Донсков С.И., Морочков В.А. Группы крови человека. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.
2. Гильмутдинов Р.Г., Епифанова А.А., Колупаев В.Е. Верификация в сложных случаях группового типирования крови по системе АВ0 у реципиентов. *Справочник заведующего КЛД*. 2017; 9: 44-58.
6. Попонина Е.А., Бутина Е.В., Татаурова И.П., Шерстнев Ф.С., Зорина Н.А., Зайцева Г.А. и др. Клинический случай трансформации АВ0- принадлежности пациента в процессе лечения онкогематологического заболевания. *Трансфузиология*. 2018; 19(3): 46-54.
7. Каландаров Р.С., Головкина Л.Л., Васильева М.Н., Стремоухова А.Г., Пушкина Т.Д., Атрощенко Г.В. и др. Генотипирование групп крови систем АВ0 и резус у пациентов после множественных гемотрансфузий. *Онкогематология*. 2017; 12(2): 70-9.
8. Бутина Е.В., Коряковцева Т.А., Максимов О.Д., Шерстнев Ф.С.,

Караваяева А.В., Зайцева Г.А. Результаты скрининга и идентификации антиэритроцитарных антител у пациентов гематологической клиники. *Трансфузиология*. 2018; 19(1): 57-65.

12. Минеева Н.В., Гавровская С.В., Кробинец И.И., Пашкова И.А., Бодрова Н.Н., Сысоева Е.А. Частота выявления антиэритроцитарных, антилейкоцитарных, антитромбоцитарных антител у больных гематологическими заболеваниями. *Онкогематология*. 2013; 4: 13-7.

REFERENCES

1. Donskov S.I., Morokov V.A. Blood groups [Gruppy krovi cheloveka]. Moscow: GEOTAR-Media; 2011. (in Russian)
2. Gil'mutdinov R.G., Epifanova A.A., Kolupaev V.E. Verification in complex cases of group typing of blood according to the ABO system in recipients. *Spravochnik zaveduyushego KLD*. 2017; 9: 44-58. (in Russian)
3. Cumulative data 1996-2003 in serious hazards of transfusion. Annual report 2003. SHOT Office 2004.
4. Nambiar R.K., Narayanan G., Prakash N.P., Vijayalakshmi K. Blood group change in acute myeloid leukemia. *Proceedings* (Baylor University Medical Center). 2017; 30 (1):74-5.
5. Wagner F.F., Frohmajer A., Ladewig B., Eicher N.I., Lonicer C.B., Müller T.H. et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*. 2000; 95(8): 2699-708.
6. Poponina E.A., Butina E.V., Tataurova I.P., Sherstnev F.S., Zorina N.A., Zaitseva G.A. et al. Clinical case of transformation of patient's AB0-accessory in the course of treatment of hematological malignancy. *Transfuziologiya*. 2018; 19(3): 46-54. (in Russian)
7. Kalandarov R.S., Golovkina L.L., Vasilieva M.N., Stremouchova A.G., Pushkina T.D., Atroshchenko G.V. et al. Genotyping of AB0 and Rh systems blood groups in patients after multiple transfusions. *Onkogematologiya*. 2017; 12(2): 70-9. (in Russian)
8. Butina E.V., Koryakovtseva T.A., Maximov O.D., Sherstnev F.S., Karavaeva A.V., Zaitseva G.A. Results of screening and identification of red blood cells antibodies in patients of the hematological clinic. *Transfuziologiya*. 2018; 19(1): 57-65. (in Russian)
9. Kormoczi G., Mayr W. Responder individuality in red blood Cell alloimmunization. *Transfus. Hemother.* 2014; 41(6): 446-51.
10. Zalpuri S., Middelburg R.A., Schonewille H., de Vooght K.M., le Cessie S., van der Bom J.G. et al. Intensive red blood cell transfusions and risk of alloimmunization. *Transfusion*. 2014; 54(2): 278-84.
11. Gottvall T., Filbey D. Alloimmunization in pregnancy during the years 1992-2005 in the central west region of Sweden. *Acta Obstet. Gynecol. Scand*. 2008; 87(8): 843-8.
12. Mineeva N.V., Gavrovskaya S.V., Krobinets I.I., Pashkova I.A., Bodrova N.N., Sysoeva E.A. Frequency of red cells, leukocytic and platelet alloantibodies in patients with hematological diseases. *Onkogematologiya*. 2013; 4: 13-7. (in Russian)

Поступила 20.03.19

Принята к печати 23.03.19

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Путова М.В., Носкова К.К., Поморцев Б.А., Семенов Н.Е., Израйлов Р.Е.

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНТРАОПЕРАЦИОННЫХ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ СМЫВОВ ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

ГБУЗ Московский клинический научный центр имени А.С. Логинова, 111123, Москва, Россия

Диагностика микроканцероматоза брюшины является важнейшей задачей, позволяющей определить тактику лечения при раке желудка. Для ее решения на предоперационном этапе выполняется диагностическая лапароскопия с перитонеальным смывом и последующим цитологическим исследованием. Цель работы: совершенствовать цитологическую диагностику перитонеальных смывов с помощью иммуноцитохимических методик и cell block метода. Работа проводилась на материале 276 операционных перитонеальных смывов у больных раком желудка, находившихся на лечении в отделе высокотехнологической хирургии с июня 2016 по июнь 2018 года. В результате была выбрана оптимальная панель моноклональных антител (Ber-EP4, CEA, CK20), позволившая повысить чувствительность с 52% до 96% и специфичность цитологической диагностики с 80% до 98%, а общую точность метода с 67% до 98%.

Ключевые слова: иммуноморфологическое исследование; цитологическая диагностика; свободные опухолевые клетки; рак желудка.

Для цитирования: Путова М. В., Носкова К. К., Поморцев Б. А., Семенов Н. Е., Израйлов Р. Е. Цитологическая диагностика интраоперационных перитонеальных смывов при раке желудка. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (4): 225-228. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-225-228>

Putova M. V., Noskova K. K., Semenov N. E., Pomortsev B. A., Izrailov R. E.

CYTOLOGICAL DIAGNOSTICS OF INTRAOPERATIVE PERITONEAL WASHES IN GASTRIC CANCER

The Moscow Clinical Scientific Centre of the State Budgetary Healthcare Institution named after Loginov A.S. Moscow Health Department, Moscow, Russia

Diagnosis of peritoneal microcanceromatosis is the most important task allowing to determine treatment strategy for patients with stomach cancer. Laparoscopy combined with peritoneal flushing and subsequent cytological examination should be performed to detect the peritoneal microcanceromatosis at the preoperative stage. The objective of this work was to improve cytological diagnostics of peritoneal washings using immunocytochemical techniques and the cell block method. The work was carried out on the basis of 276 surgical peritoneal washings in patients with stomach cancer who were on treatment in the department of high-tech surgery of the Moscow Clinical Scientific Centre of the State Budgetary Healthcare Institution named after Loginov A.S. from June 2016 to June 2018. As a result, the optimal panel of monoclonal antibodies (Ber-EP4, CEA, CK20) was chosen, which increased the sensitivity from 52% to 96% and the specificity of cytological diagnosis from 80% to 98%, and the overall accuracy of the method from 67% to 98%.

Key words: immunomorphological markers; cytological exam; free cancer cells; gastric cancer.

For citation: Putova M. V., Noskova K. K., Semenov N. E., Pomortsev B. A., Izrailov R. E. Cytological diagnostics of intraoperative peritoneal washes in gastric cancer. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)/ 2019; 64 (3): 225-228 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-3-225-228>

For correspondence: Putova M.V., biologist clinical laboratory diagnostics; e-mail: mputova@bk.ru

Information about authors:

Putova M., <https://orcid.org/0000-0002-0825-7148>

Semenov N., <https://orcid.org/0000-0001-5543-199X>

Noskova K., <https://orcid.org/0000-0001-5734-0995>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.11.2018
Accepted 01.03.2019

Введение. Рак желудка остается одной из самых распространенных форм злокачественных опухолей человека. Ежегодно в мире заболевает около 1 млн человек.

В структуре онкологической смертности рак желудка занимает третье место. В Российской Федерации ежегодно регистрируют около 39 тыс. новых случаев рака желудка и более 34 тыс. больных умирает от этого заболевания [1, 2].

Выбор лечебной тактики при раке желудка определя-

Для корреспонденции: Путова Мария Вадимовна, биолог; e-mail: mputova@bk.ru

ется стадией опухолевого процесса. Одной из основных проблем стадирования рака желудка у больных является исключение канцероматоза в начальной стадии, когда еще нет асцитической жидкости и видимых признаков метастатического поражения брюшины [3,4]. По рекомендациям NCCN (Американского Национального Общества по раку) наличие свободных опухолевых клеток в перитонеальном смыве расценивается как отдаленное метастазирование (M1), а лапароскопическое исследование с перитонеальным смывом является обязательным методом предоперационного обследования больных местнораспространенными формами рака желудка [1,4]. Согласно последним Российским рекомендациям Ассоциации онкологов России всем больным с резектабельным местнораспространенным раком желудка необходимо выполнять диагностическую лапароскопию с перитонеальным смывом для исключения канцероматоза брюшины.

По данным F.Tustumı с соавт. [5–7] обнаружена четкая связь между наличием свободных опухолевых клеток (СОК) в брюшной полости и неблагоприятным прогнозом заболевания. Больные с наличием СОК имели высокую частоту метастазирования в лимфатические узлы, наличие инвазии в серозную оболочку, рецидивов в течение 60 месяцев и низкую общую 3-х летнюю выживаемость [4]. Прогноз в этой группе пациентов сопоставим с больными, находящимися на симптоматической химиотерапии без оперативного лечения. Это обуславливает важность определения на дооперационном этапе групп пациентов с микроканцероматозом.

Цитологическое исследование перитонеальных смывов имеет определенные сложности, обусловленные разрушающим воздействием физиологического раствора на клетки (изменение формы, границ клетки, клеточной мембраны). Клетки мезотелия округляются, ядро часто теряет центральное расположение, в хроматине просматриваются не визуализируемые в мезотелиальных клетках ядрышки и нуклеолы. Клетки часто расположены разрозненно, в отличие от клеток мезотелия в выпотной жидкости, где одним из критериев определения мезотелиальных клеток является наличие кластерных структур [8].

Дегенеративные изменения при попадании в физиологический раствор происходят также с клетками рака, поэтому дифференцировать единичные клетки аденокарциномы, перстневидноклеточного рака и клетки низкодифференцированной карциномы от дегенеративно измененных клеток мезотелия в перитонеальном смыве не простая задача даже для опытного морфолога [9]. По

данным литературы, чувствительность цитологического метода традиционной световой микроскопии для диагностики клеток рака составляет 34,5 – 89%, а специфичность 36 – 76,9% [10,11]. Таким образом, встает вопрос о необходимости поиска путей повышения общей точности цитологического исследования, как метода диагностики СОК.

По данным Jo-Neon Kim с соавт. [12, 13] комбинация цитологического, иммуноцитохимического метода и технологии cell block позволяет увеличивать чувствительность исследований до 90% и специфичность до 97%. В свою очередь применение двух и более МКАТ позволяет улучшить эти показатели до 99% и 100%, соответственно.

Цель работы – совершенствование цитологической диагностики перитонеальных смывов с использованием иммуноморфологических методик для выявления СОК при раке желудка.

Материал и методы. Материал для исследования получен из отделения высокотехнологичной хирургии ГБУЗ МКНЦ им. А.С. Логинова ДЗМ.

Выполнен анализ 276 операционных перитонеальных смывов у больных раком желудка, находившихся на лечении в отделении высокотехнологичной хирургии с июня 2016 по июнь 2018 года. Перитонеальные смывы получены при диагностической лапароскопии. Средний возраст пациентов составил 64 года (32 – 86 лет), из них 140 женщин и 136 мужчин. В 185 из 276 (67%) случаях было проведено традиционное цитологическое исследование. В процессе исследования нами определены следующие структурно-морфологические признаки опухолевых клеток в перитонеальных смывах (табл. 1).

При необходимости, если результат исследования был неоднозначный и/или противоречил клиническим и лабораторным данным, иммуногистохимическое исследование проводилось на материале, приготовленном методом клеточного блока. Однако, следует отметить, что данная методика на материале смывов показала сомнительные результаты в связи с малым количеством клеточного материала. В нашем исследовании клеточные блоки в 80% случаев были умеренно или гипоклеточными, вследствие чего данный метод был выбран как вспомогательный.

В 91 из 276 (33%) кроме традиционной световой микроскопии было проведено иммуноцитохимическое исследование на цитологических препаратах и/или клеточных блоках. Цитологические препараты готовились по жидкостной методике на цитоцентрифуге Cyto-Tek. Контролем наличия необходимого количества клеточ-

Таблица 1

Структурно-морфологические признаки мезотелиальных и опухолевых клеток в перитонеальных смывах

Клеточный и/или структурный признак	Мезотелиальные клетки	Опухолевые клетки
Ядерно-цитоплазматическое соотношение	Смещено в пользу цитоплазмы, реже в пользу ядра	Смещено в пользу ядра
Гиперхромия клеток или ядра	Слабо выражена	Сильно выражена
Дискариоз ядер	Не отмечался	Отмечался часто
Наличие перстневидных клеток	В качестве редких находок	Отмечался в 90% диссеминации перстневидноклеточного рака
Наличие визуализируемых ядрышек	Умеренно выражен	Сильно выражен
Кластерные и/или шаровидные структуры, гиперхромные структуры	Выражен слабо	Сильно выражен
Наслоение ядер в структурах	Выражен слабо	Сильно выражен

Диагностическая информативность методов выявления микроканцероматоза

Метод	Диагностическая лапароскопия (макроскопическая оценка) <i>n=185</i>	Световая микроскопия <i>n=185</i>	Световая микроскопия + ИЦХ исследование (Ber-EP4, CEA, CK20) + cell block <i>n=91</i>
Чувствительность (Se)	92%	52%	96%
Специфичность (Sp)	54%	80%	98%
Общая точность (OT)	63%	67%	98%

ного материала служили цитологические препараты, окрашенные по Паппенгейму. Иммуноцитохимическое исследование проводилось с антителами фирмы Rabbit Monoclonal Primary Antibody (Roche, Франция), диагностическими наборами *ultraView Universal DAB Detection Kit* (Roche, Франция), на автоматическом иммуногисто-стейнере Ventana BenchMark XT (Roche, Франция). Была выбрана следующая панель МКАТ: Ber-EP4, CEA, CK7, CK20.

Результаты. Разработка. По результатам традиционной световой микроскопии СОК обнаружены у 80 из 185 (43%) пациентов (в твердительной или предположительной форме). У 104 из 185 (56,4%) пациентов опухолевых клеток в перитонеальном смыве не обнаружено, в одном случае (0,6%) материал был не информативным из-за выраженной дегенерации клеточных элементов.

Хирургическое лечение проведено 31 из 104 (30%) больному из группы с отрицательным результатом исследования перитонеальных смывов на СОК.

На основании данных мировой литературы, достоверно показавших корреляцию между инвазией первичной опухоли за пределы серозной оболочки желудка и риском имплантационного метастазирования (появления микро- и макроканцероматоза брюшины), нами были сопоставлены результаты патогистологического исследования операционных органокомплексов (с оценкой глубины инвазии опухоли) с результатами цитологического исследования перитонеальных смывов [14,15].

Обсуждение. Рассчитанная положительная (PPV) и отрицательная (PVN) прогностическая значимость теста, составила 69% и 67%, соответственно. Чувствительность световой микроскопии составила 52%, специфичность 81%, общая точность метода 67%. Точность данного метода исследования перитонеальных смывов была сопоставима с общей точностью макроскопической оценки прорастания опухоли серозной оболочки при диагностической лапароскопии (63%).

Полученные данные свидетельствовали о необходимости повышения точности исследования.

Для реализации этой задачи, наряду с общепринятым световым методом, было применено иммуноцитохимическое исследование.

Так у 91 (33%) из 276 пациентов цитологическое исследование перитонеальных смывов начиналось со световой микроскопии препаратов и одновременно с этим проводилось ИЦХ исследование. По данным литературы наиболее чувствительными и специфичными МКАТ для выявления клеток рака желудка в жидкости являются Ber-EP4, CEA, CK20, CK7 [9,12,14]. Это послужило основой выбора иммуноцитохимической панели в нашем исследовании. Однако, в процессе исследования была отмечена положительная экспрессия CK7 в клетках мезотелия в 52% случаев (рис. 1, 2 см. обложку), что

на наш взгляд не позволяет использовать данный маркер в диагностике клеток рака желудка в перитонеальном смыве. На основании полученных данных СК7 из панели был исключен.

В результате 91 комбинированного исследования было выявлено 26 (29%) положительных на СОК и 65 (71%) отрицательных случаев. У 21 пациента из 65 (32%), с отрицательным результатом на СОК, было проведено хирургическое лечение с последующим гистологическим исследованием операционного материала.

Из них в 20 случаях патогистологическое исследование не выявило инвазии опухоли за пределы серозной оболочки желудка, что было сопоставимо с результатами цитологического исследования перитонеальных смывов. Тем не менее, у одного пациента с отрицательным результатом цитологического исследования (4,7%) было диагностировано прорастание серозной оболочки.

Таким образом, используя комбинированную световую и иммуноцитохимическую методики, удалось повысить чувствительность и специфичность цитологической диагностики перитонеальных смывов на 44% и 18% соответственно. Общая точность метода достигла 98%. Результаты представлены в табл. 2.

Положительная прогностическая значимость теста (PPV) составила 96%, отрицательная (PVN) 98%.

Выводы

1. Использование только световой микроскопии для выявления свободных опухолевых клеток в перитонеальном смыве недостаточно, так как клеточные элементы подвержены значительным изменениям, единичные клетки рака трудно дифференцируемы среди мезотелия, гистиоидных и других элементов фона.

2. Иммуноцитохимическое исследование с применением комбинации моноклональных антител к Ber-EP4, CEA, CK20 повышает чувствительность с 52% до 96% и специфичность цитологической диагностики с 80% до 98%, а общую точность метода с 67% до 98%.

3. Повышение диагностической точности цитологического исследования свободных опухолевых клеток в перитонеальном смыве у больных раком желудка достигается применением комбинации световой микроскопии с иммуноцитохимическим исследованием.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–7, 11–15 см. REFERENCES)

- Бяхов М. Ю., Бесова Н. С., Владимирова Л. Ю., Волков Н. М., Левченко Е. В., Сакаева Д. Д. и соавт. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака желудка. *Злокачественные опухоли*. 2016; 4 (Спецвыпуск 2): 234–24.
- Липова В.А., Котов В.А. Дифференциальная диагностика опухо-

ЦИТОЛОГИЯ

лей по клеточному составу серозных жидкостей: учебное пособие для врачей. СПб: Наука; 2003.

9. Дорошенко А.М., Дворниченко В.В., Голодников М.А., Пленкин С.М., Миронов П.В., Наталинов Д.И., Лисичникова И.В., Кислицына Л.Ю. Использование цитологического исследования с применением иммуноцитохимического анализа интраоперационных перитонеальных смывов у больных с низкодифференцированным раком желудка. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2010; 5: 40-3.
10. Амелюшкина В.А. Новая технология для стандартизированного приготовления цитологических препаратов. *Лабораторная медицина*. 2003; 6: 12-4.

REFERENCES

1. Byakhov M. Yu., Besova N. S., Vladimirova L. Yu., Volkov N. M., Levchenko E. V., Sakayeva D. D. i soavt. Prakticheskiye rekomendatsii po lekarstvennomu lecheniyu raka zheludka. *Zlokachestvennyye opukholy*. 2016; 4 (Spetsvyпуск 2): 234–24. (in Russian)
2. Jernal A., Bray F. Global Cancer Statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2011; 61; 69-90.
3. Romano F1, Cesana G, Berselli M, Gaia Piacentini M, Caprotti R, Bovo G, Uggeri F. J. Biological, histological, and clinical impact of preoperative IL-2 administration in radically operable gastric cancer patients. *Surg. Oncol*. 2004. 15;88(4): 240-7.
4. Hoskovec D., Varga J., Dytrych P., Konecna E., Matek J. Peritoneal lavage examination as a prognostic tool in cases of gastric cancer. *Gastric cancer*. 2017; 1:13(3): 612-6.
5. A systematic review of the accuracy and utility of peritoneal cytology in patients with gastric cancer. *Gastric cancer*. 2011; 1:15(3): 510-5.
6. Tustumi F, Bernardo WM, Dias AR, Ramos MF, Cecconello I, Zilberstein B, Ribeiro-Júnior U. Detection value of free cancer cells in peritoneal washing in gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clinics (Sao Paulo)*. 2016; 1:71(12): 733-45.
7. Yonemura Y, Kawamura T, Bandou E, Tsukiyama G, Endou Y, Miura M. The natural history of free cancer cells in the peritoneal cavity.

In: *Gonzalez-Moreno S, editor. Advances in Peritoneal Surface Oncology*. Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2007; 11–23.

8. Lipova V.A., Kotov V.A. Differential diagnosis of tumors according to the cellular composition of serous fluids: manual for doctors. St.Petersburg: Nauka; 2003. (in Russian)
9. Doroshenko A.M., Dvornichenko V.V., Golodnikov M.A., Plenkin S.M., Mironov P.V., Natalinov D.I., Lisichnikova I.V., Kislitsyna L.YU. The use of cytological studies using immunocytochemical analysis of intraoperative peritoneal lavages in patients with low differentiated gastric cancer. *Byulleten' VSNC SO RAMN*. 2010; 5: 40-3. (in Russian)
10. Amelyushkina V.A. New technology for standardized preparation of cytological preparations. *Laboratornaya meditsina*. 2003; 6: 12-4. (in Russian)
11. Kodera Y., Nakanishi H., Yamamura Y., Shimizu Y. Prognostic value and clinical implications of disseminated cancer cells in the peritoneal cavity detected by reverse transcriptase–polymerase chain reaction and cytology. *Int.J.Cancer predict.Oncol*. 1998; 79: 429–33.
12. Hui Zhang, Jia Wen, Pi Li Xu, Rui Chen, Xi Yang, Lian Er Zhou et al. Role of Liquid based Cytology and Cell Block in the Diagnosis of Endometrial Lesions Immunocytochemical Panel for distinguishing between adenocarcinomas and reactive mesothelial cells in effusion Cell Blocks. *Chinese Medical Journal*. 2016; 129(12): 1459-63.
13. Jo-Heon Kim, M.D., Ga-Eon Kim, M.D., YooDuk Choi, M.D., Ji Shin Lee, M.D., Jae Hyuk Lee, M.D., Jong-Hee Nam, M.D., and ChanChoi, M.D. *Diagn. Cytopathol*. 2009; 37: 258–61.
14. Bando E., Kavamura T., Takashi S. Magnitude of serosal changes predicts peritoneal recurrence of gastric cancer. *J.Am.Coll.Surg*. 2003; 197(2): 212-22.
15. Kusamura S, Baratti D, Zaffaroni N, Villa R, Laterza B, Balestra MR. Pathophysiology and biology of peritoneal carcinomatosis. *World J Gastrointest Oncol*. 2010 Jan 15; 2(1)

Поступила 01.11.18
Принята к печати 01.03.19

© ПЕТРАШОВА Д.А., 2019

Петрашова Д.А.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БУККАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ У ШКОЛЬНИКОВ СТАРШЕГО ВОЗРАСТА, ПРОЖИВАЮЩИХ В ВЫСОКИХ И СРЕДНИХ ШИРОТАХ

ФИЦ Кольский научный центр РАН, 184209, Апатиты

Развитие северных регионов РФ связано с добычей и переработкой природных ресурсов, что приводит к загрязнению окружающей среды и делает актуальным задачи санитарно-гигиенического мониторинга. Одним из методов токсикологических исследований популяций человека является хорошо себя зарекомендовавший микроядерный тест на клетках буккального эпителия. Отсутствие исследований по межширотному сравнению результатов цитогенетических исследований затрудняет сопоставление получаемых в АЗРФ результатов с данными из более южных районов. Цель данного исследования состоит в сравнении цитогенетических нарушений в буккальном эпителии у двух групп школьников старшего возраста, проживающих в высоких и средних широтах. Исследование проводилось в г. Апатиты Мурманской области (67°34'03" с. ш., 33°23'36" в. д.) и г. Серпухов Московской области (54° 54' 56» с.ш., 37° 24' 40» в.д.). Всего обследован 61 ребенок: 41 ребенок из г. Апатиты и 20 детей из г. Серпухова (16-18 лет). Микроядерный тест проводился согласно международному протоколу. Показано, что средние значения частоты встречаемости клеток с микроядрами в группах сравнения школьников, проживающих в высоких и средних широтах, достоверно не отличались и не превышали показатели для среднепопуляционной нормы. Частота встречаемости клеток с ядерными почками и двумя ядрами была достоверно выше в группе школьников, проживающих в средних широтах, что, в свою очередь, компенсируется более высокой скоростью элиминации клеток с нарушениями. Следовательно, при сопоставлении данных микроядерного теста на клетках буккального эпителия вполне допустимо не учитывать широту проживания исследуемых групп.

Ключевые слова: микроядра; буккальный эпителий; микроядерный тест; индекс репарации; высокие широты; Арктика.

Для цитирования: Петрашова Д.А. Цитогенетические особенности буккального эпителия у школьников старшего возраста, проживающих в высоких и средних широтах. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (4): 229-233
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-229-233>

Petrashova D.A.

BUCCAL EPITELIUM CYTOGENETIC STATUS IN SCHOOLCHILDREN LIVING IN HIGH AND MIDDLE LATITUDES

Kola Science Centre, Russian Academy of Sciences, Apatity, 184209, Russia, dinapetrashova@mail.ru

The Russian northern regions development is associated with the extraction and processing of natural resources, which leads to environmental pollution and makes the task of sanitary-hygienic monitoring relevant. Buccal micronucleus cytome assay is one of the toxicological methods for human population studies. Studies on the inter-latitudinal comparison of Buccal micronucleus cytome assay are lacking, therefore there are difficulties in comparing the results obtained in the Russian Arctic with data from more southern regions. The aim of this study is to compare cytogenetic abnormalities in the buccal epithelium in two groups of older schoolchildren living in high and middle latitudes. The study was conducted in the city of Apatity (Murmansk region, 67 ° 34'03 " N, 33 ° 23'36 " E) and the city of Serpukhov (Moscow region, 54 ° 54 '56 " N, 37 ° 24 '40 " E). A total of 61 children were examined: 41 children from the Apatity and 20 children from the Serpukhov (16-18 years old). The Buccal micronucleus cytome assay was carried out according to an international protocol. It was shown that the average frequency values of the cells with micronucleus in the comparison groups of schoolchildren living in high and middle latitudes did not significantly differ and did not exceed the values for the average population norm. The frequency of cells with nuclear buds and two nucleus was significantly higher in the group of schoolchildren living in middle latitudes, which, in turn, is compensated by a higher rate of elimination of cells with impaired. Therefore, when comparing Buccal micronucleus cytome assay data, it is quite possible not to take into account the breadth of the studied groups.

Key words: micronucleus; buccal cells; Buccal micronucleus cytome assay; repair index; high latitude; Arctic.

For citation: Petrashova D.A. Buccal epithelium cytogenetic status in schoolchildren living in high and middle latitudes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (4): 229-233 (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-229-233>

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

Information about author:

Petrashova D.A., <http://orcid.org/0000-0003-3997-637X>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 25.03.2019
Accepted 29.03.2019

Введение. Согласно эпидемиологическим данным, заболеваемость и смертность от злокачественных новообразований повышена среди жителей высоких широт Земли. Данный градиент отмечен как в масштабах Европейской части России так и масштабах всей планеты [1–4]. При этом определенный вклад в заболеваемость жителей арктического региона вносят высокоширотные космо- и гелиофизические агенты, ассоциированные с солнечной активностью [5]. Проживание на Севере повышает чувствительность к воздействию высокоширотных факторов среды и сужает адаптационный диапазон.

Вместе с тем, развитие северных регионов РФ в большой степени связано с добычей и переработкой природных ресурсов, что приводит к загрязнению окружающей среды и делает актуальными задачи санитарно-гигиенического мониторинга. Одним из методов токсикологических исследований популяций человека является микроядерный тест на клетках буккального эпителия, который хорошо себя зарекомендовал и получил довольно широкое распространение [6]. В Арктической зоне РФ такой мониторинг проводится на Кольском полуострове и в Ямало-Ненецком автономном округе [7-9]. Однако, в литературе нет исследований по межширотному сравнению, что затрудняет сопоставление получаемых в АЗРФ результатов с данными из более южных районов.

Цель данного исследования состоит в сравнении цитогенетических нарушений в буккальном эпителии у двух групп школьников старшего возраста, проживающих в высоких и средних широтах. Выбор детей старшего школьного возраста для исследования обусловлен следующими причинами: а) дети более чувствительны к генотоксическим агентам, чем взрослые [10]; б) меньше подвержены миграции, чем взрослые; в) легче интервьюируются, чем школьники младшего возраста.

Материал и методы. Выбор исследуемых территорий. Для проведения исследования необходимо было подобрать схожие населенные пункты, расположенные в разных широтах. Критериями отбора являлись схожая транспортная доступность, отсутствие градообразующего предприятия, схожая экологическая обстановка, схожий уровень оказания медицинской помощи, схожий возрастной состав населения, общие сети поступления продуктов питания.

Среди регионов России, находящихся за Полярным кругом, наилучшей транспортной доступностью обладает Мурманская область. Город Апатиты Мурманской области (67°34'03" с. ш., 33°23'36" в. д.) является единственным городом, в котором нет градообразующего предприятия. Транспортная доступность – автомобильная дорога, железная дорога и аэропорт (14 км).

В качестве города-сравнения, расположенного в средних широтах, был выбран г. Серпухов Московской области (54° 54' 56" с.ш., 37° 24' 40" в.д.), поскольку он соответствовал описанным выше критериям. Важным моментом является то, что данные муниципальные образования сопоставимы между собой по качеству оказания медицинской помощи населению, по оснащенности диагностической аппаратурой и по профессиональному медицинскому составу. Имеется сходство и по демографическим показателям [3].

Исследуемые группы. Всего для исследования буккального эпителия был выбран 61 ребенок из г. Апатиты и 20 детей из г. Серпухова. Исследование проводилось в школах среди учеников 10-11 классов

(16–18 лет). Перед началом исследования были получены информированные согласия на участие.

Перед взятием образцов буккального эпителия проводилось интервьюирование по специальному опроснику, который включал в себя вопросы относительно питания, вредных привычек, роста, веса, вакцинации, употребления витаминов и медикаментозных препаратов, хронических и острых заболеваний, прохождения рентгенологических обследований, семейной истории относительно онкологических заболеваний, образа жизни. Также проводилось психологическое тестирование (Тест САН, шкала тревожности Спилберга-Ханнина).

Критерии исключения: онкологические заболевания в семейной истории, наличие хронических заболеваний легких, диабет и ожирение, курение, употребление алкоголя, употребление витаминов в течение месяца, простудные заболевания в течение месяца, прохождения рентгенологических исследований в течение полугодия, использование в питании продуктов с приусадебного хозяйства, вегетарианство, высокий уровень тревожности.

Микроядерный тест на буккальном эпителии. Клетки буккального эпителия собирались путем взятия мазков стерильным деревянным шпателью с внутренней стороны щеки. Перед взятием образцов школьников просили прополоскать рот дистиллированной водой. Шпатель с клетками эпителия ополаскивался в буферном растворе, который затем переливался в пробирки по 10 мл. Образцы промывались, фиксировались на предметном стекле и окрашивались ацетоорсеином. Для каждого образца анализировалось не менее 2000 клеток при увеличении 1000х с использованием масляной иммерсии (АХЮ-STAR PLUS, Karl Zeiss). Микроядра и другие аномалии ядра определяли согласно международному протоколу [11]. В данном исследовании определялись следующие показатели: а) клетки с нарушением ДНК (микроядро, ядерная почка, разбитое яйцо и прочие протрузии); б) клетки с нарушением пролиферации (двуядерные клетки, круговая насечка); в) показатели клеточной смерти (конденсация хроматина, кариорексис, пикноз, кариолизис и клетки с апоптозными телами).

Все полученные данные были внесены в специальную базу данных [12]. Частота микроядер и других аномалий ядра представлены как средняя частота на 1000 клеток с ошибкой. Индекс репарации рассчитывался по формуле:

$$RI = (KL + KR) / (MN + BE),$$

где KL — частота встречаемости клеток с кариолизисом, KR — частота встречаемости клеток с кариорексисом, MN — частота встречаемости клеток с микроядрами, BE — частота встречаемости клеток с протрузией по типу «разбитое яйцо» [13]. Достоверность различий между группами определялась согласно критерию Манна-Уитни. Критический уровень для подтверждения нулевой гипотезы принимался в 5% ($p < 0,05$). Статистический анализ был выполнен с использованием пакета Statistica 10.0.

Результаты. Средние значения частоты клеток с микроядрами в исследуемых группах достоверно не отличалось и не превышало показатели для среднепопуляционной нормы в 2-4% [14] (см. таблицу).

У школьников, проживающих в г. Серпухов, достоверно выше частота клеток с ядерными почками, показателями нарушения пролиферации клеток и кариолизисом. А у школьников из г. Апатиты достоверно выше ча-

Частота встречаемости нарушений

Показатель	Высокие широты г. Апатиты (n=41)	Средние широты г. Серпухов (n=20)
Цитогенетические нарушения, ‰		
Частота клеток с микроядрами	4,0±0,51	3,4±0,37
Частота клеток с ядерными почками	2,7±0,90*	4,8±0,81
Частота клеток с протрузией «разбитое яйцо»	0,8±0,17	0,7±0,23
Частота клеток с прочими протрузиями	1,4±0,38	2,3±0,55
Показатели пролиферации, ‰		
Частота клеток с двумя ядрами	2,6±0,49*	4,0±0,64
Частота клеток с круговой насечкой	0,5±0,11*	2,0±0,47
Стадии деструкции ядра, ‰		
Частота клеток с конденсацией хроматина	4,8±0,54*	2,6±0,52
Частота клеток с кариолизисом	63,1±2,43*	79,7±2,40
Частота клеток с кариорексисом	0,2±0,03	0,1±0,05
Частота клеток с кариопикнозом	0,4±0,07	0,5±0,14
Частота клеток с апоптозными телами	4,1±0,54*	1,6±0,54
RI	19,3±2,61*	25,3±3,08

Примечание. * – различия достоверны ($p \leq 0,05$); n – количество обследуемых.

стота клеток с конденсацией хроматина и апоптозными телами (см. таблицу).

Обсуждение. Буккальный эпителий характеризуется высокой скоростью обновления и, следовательно, более выраженной чувствительностью к мутагенам эндогенной и экзогенной природы. Микроядерный тест на буккальном эпителии позволяет идентифицировать как эффекты, связанные с повреждением генома (образование микроядер и ядерных почечек), так и эффекты, связанные с различными проявлениями вариантов гибели клеток - апоптоз и некроз (конденсированный хроматин в ядро, пикноз ядра, кариорексис и др.) [11, 15, 16].

Микроядра являются признанными биомаркерами генотоксического действия различных факторов. Они представляют собой отдельную часть генетического материала вне основного ядра, которая является либо фрагментом хромосомы, образованной в результате повреждения ДНК, либо одной или несколькими целыми хромосомами, отстающими в анафазе и не включенными в основное ядро [17]. Увеличение частоты клеток с микроядрами в полости рта является наиболее ранним проявлением риска развития рака полости рта [18]. Данное исследование показывает отсутствие достоверных различий по частоте встречаемости клеток с микроядрами между группами школьников, проживающих в высоких и средних широтах.

Частота встречаемости протрузий, таких как ядерная почка и «разбитое яйцо», также является важным показателем микроядерного теста. Механизм их появления до конца не изучен и все еще остается спорным. Предполагается, что протрузии являются результатом дегенеративных клеточных изменений [19]. Однако ряд авторов объясняют такие ядерные аномалии как результат генотоксических эффектов [20-22], эпигенетических процессов [23] или отделения части ядра во время S-фазы [24]. В то же время ряд исследователей предлагают рассматривать образование протрузий как результат цитогенетических нарушений, поскольку при воздействии мутагенов было показано значительное увеличение их частоты [25-28]. В то же время предполагается, что появление ядерных почечек может быть связано с элиминацией амплифицированной ДНК и процессами репарации ДНК [19, 23, 24, 29].

Для оценки степени нарушения пролиферации клеток буккального эпителия учитываются клетки с двумя и более ядрами и круговой насечкой. Существуют доказательства того, что двуядерные и многоядерные клетки образуются в основном в результате полиплоидизирующего ацитокинетического митоза [30]. Круговая насечка или сдвоенное ядро образуется в процессе неполного митоза в результате повреждения веретена деления, когда нарушается не только цитотомия, но и кариотомия [31]. Происхождение ядер с круговой насечкой не связано с прямым воздействием генотоксиканта на ДНК. Предполагается, что этот эффект возникает на заключительных этапах деления клеток [31].

В данном исследовании частота встречаемости клеток с ядерными почками и двумя ядрами была достоверно выше в группе школьников, проживающих в средних широтах. Предыдущие наши исследования на клетках лимфоцитов показали, что у подростков из Серпуховского района скорость деления клеток выше, чем у школьников из Мурманской области [32]. Возможно, из-за большей скорости деления клеток у школьников, проживающих в средних широтах, больше возникает таких цитогенетических нарушений как наличие ядерных почечек и двуядерных клеток. Однако, нельзя исключить, что при планировании исследования были учтены не все факторы.

Считается, что процесс кластогенеза может переходить в стадию мутагенеза, который в свою очередь может переходить в стадию канцерогенеза. Однако организм человека обладает гомеостазом. В клетках буккального эпителия гомеостаз реализуется за счет устранения поврежденных клеток посредством кариорексиса и кариолиза. Ряд авторов предлагает динамику канцерогенеза в буккальном эпителии отражать посредством индекса репарации (RI) [13, 33]. В нашем исследовании RI был значительно ниже у обследуемых в г. Апатиты, чем в г. Серпухов. Это свидетельствует о более высокой скорости элиминации поврежденных клеток у школьников, проживающих в средних широтах. Следовательно, повышенная частота двуядерных клеток и клеток с ядерными почками у школьников из

г. Серпухова компенсируется более высокой скоростью элиминации.

Заключение. Проведенное исследование показало, что средние значения частоты встречаемости клеток с микроядрами в группах сравнения школьников, проживающих в высоких и средних широтах, достоверно не отличались и не превышали показатели для среднепопуляционной нормы. В тоже время частота встречаемости клеток с ядерными почками и двумя ядрами была достоверно выше в группе школьников, проживающих в средних широтах, что, в свою очередь, компенсируется более высокой скоростью элиминации клеток с нарушениями. Следовательно, при сопоставлении данных микроядерного теста на клетках буккального эпителия вполне допустимо не учитывать широту проживания исследуемых групп.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность ст. научн. сотр., канд.биол.наук Петрову В.Н и научному сотруднику, канд.биол.наук Пожарской В.В. за помощь в организации исследования и взятие образцов буккального эпителия у школьников в г. Серпухов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4, 6, 7, 10,11, 13,14, 16, 18-27, 29,33 см. REFERENCES)

1. Гундаров И.А., Зильберт Н.Л. Изучение региональных различий в заболеваемости и смертности населения с позиций синдрома географической широты. *Вестник АМН СССР*. 1991;11:52-6.
3. Белишева Н.К., Петров В.Н. Проблема здоровья населения в свете реализации стратегии развития Арктической зоны Российской Федерации. *Труды Кольского научного центра*. 2013; 6 (19):20.
5. Белишева Н. К., Талыкова Л. В., Мельник Н. А. Популяционные эффекты воздействия космических лучей в высоких широтах. Медико-биологические эффекты действия радиации: материалы междунар. конф. (10-11 апреля 2012 г.). М.: ФГУ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России; 2012.
8. Шинкарук Е.В., Агбальян Е.В. Цитогенетический статус жителей Гыданского полуострова. *Гигиена и санитария*. 2016;95: 865-8.
9. Шинкарук Е.В., Агбальян Е.В., Сычева Л.П. Цитогенетический статус коренного и пришлого населения в ЯНАО. *Гигиена и санитария*. 2016; 95:140-4.
12. Петрашова Д.А., Бурцев А.В. Разработка базы данных по цитогенетическим показателям на примере исследований, проводимых в Мурманской области. *Вестник Кольского научного центра РАН*. 2016; 2(25): 124-36.
15. Полиорганный микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях. М.: Гениус Медиа; 2007.
17. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека. *Медицинская генетика*. 2007; 6(11): 3-12.
28. Мейер А.В., Толочко Т.А., Литвин А.В., Минина В.И., Кулемин Ю.Е. Кариологический статус буккальных эпителиоцитов шахтеров с профессиональными легочными патологиями. *Гигиена и санитария*. 2018;97(3): 220-5.
30. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия, пролиферация и дифференцировка. М.: Наука; 1981.
31. Юрченко В.В. Цитогенетические нарушения в эпителии щеки человека при экспозиции генотоксикантами. *Токсикологический вестник*. 2005; 6:14-21.
32. Пожарская В.В., Петрашова Д.А. Микроядра в лимфоцитах периферической крови детей и подростков проживающих в сельской местности Мурманской области. *Труды Ферсмановской научной сессии. Труды Кольского научного центра*. 2017; 8:61-6.

REFERENCES

1. Gundarov I.A., Zil'bert N.L. Study of regional differences in the population morbidity and mortality from the standpoint of geographical latitude syndrome. *Vestnik Akademii Meditsinskikh Nauk SSSR*. 1991;11: 52-6. (in Russian)
2. Kelly J.J., Lanier A.P., Alberts S., Wiggins C.L. Differences in cancer incidence among Indians in Alaska and New Mexico and US Whites, 1993-2002. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2006;15:1515-9.
3. Belisheva N.K., Petrov V.N. The Murmansk region's population health when implementing the strategy of the development of the Russian Federation's Arctic zone. *Trudy Kol'skogo nauchnogo tsentra*. 2013;6 (19): 20. (in Russian)
4. Young T.K., Kelly J.J., Friborg J., Soininen L., Wong K.O. Cancer among circumpolar populations: an emerging public health concern. *International Journal of Circumpolar Health*. 2016;75:12.
5. Belisheva N.K., Talykova L.V., Mel'nik N.A. Population effects of cosmic rays in high latitudes. Biomedical effects of radiation (10-11/04/2012). Moscow: FGU FMBC im. A. I. Burnazyana FMBA Rossii; 2012. (in Russian)
6. Bonassi S., Coskun E., Ceppi M., Lando C., Bolognesi C., Burgaz S., et al. The HUMAN Micronucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. 2011;728: 88-97.
7. Petrashova D., Martynova A., Megorskiy V. Genetic Damage in Workers from the Rare Metal Ore Production Region. *Minerals*. 2019; 9:14.
8. Shinkaruk E.V., Agbalyan E.V. Cytogenetic status of the residents of the Gydansky Peninsula (Gydan). *Gigiena i sanitariya*. 2016;95: 865-8. (in Russian)
9. Shinkaruk E.V., Agbalyan E.V., Sycheva L.P. Cytogenetic status of indigenous and alien population residing near the oil and gas industrial facilities in Nyda village of Yamalo-Nenets Autonomous Okrug. *Gigiena i sanitariya*. 2016; 95:140-4. (in Russian)
10. Neri M., Ceppi M., Knudsen L.E., Merlo D.F., Barale R., Puntoni R., et al. Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113:1226-9.
11. Thomas P., Holland N., Bolognesi C., Kirsch-Volders M., Bonassi S., Zeiger E., et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. 2009;4: 825-37.
12. Petrashova D.A., Burtsev A.V. Development of a database for the micronucleus test upon human cells. *Vestnik Kol'skogo nauchnogo tsentra RAN*. 2016;2(25):124-36. (in Russian)
13. Ramirez A., Saldanha P.H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genetics and Molecular Research (GMR)*. 2002;1(3): 246-60.
14. Tolbert P.E., Shy C.M., Allen J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears - methods development. *Mutation Research*. 1992; 271: 69-77.
15. Poly-organized micro-nuclear test in ecological and hygienic researches. Moscow: Genius Media; 2007. (in Russian)
16. Torres-Bugarin O., Zavala-Cerna M.G., Nava A., Flores-Garcia A., Ramos-Ibarra M.L. Potential Uses, Limitations, and Basic Procedures of Micronuclei and Nuclear Abnormalities in Buccal Cells. *Disease Markers*. 2014.
17. Sycheva L.P. Biological value, scoring criteria and limits of a variation of a full spectrum karyological indexes of exfoliated cells for estimation of human cytogenetic status. *Meditsinskaya genetika*. 2007; 6(11): 3-12. (in Russian)
18. Cardoso R.S, Takahashi-Hyodo S., Peitl P., Ghilardi-Neto T., Sakamoto-Hojo E.T. Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*. 2001;21: 431-9.
19. Nersesyan A.K. Nuclear buds in exfoliated human cells. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2005; 588:64-8.
20. Serrano-Garcia L., Montero-Montoya R. Micronuclei and chromatid

- buds are the result of related genotoxic events. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2001; 38: 38-45.
21. Montero R., Serrano L., Davila V., Segura Y., Arrieta A., Fuentes R., et al. Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2003;42:216-22.
 22. Zeljezic D., Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicology*. 2004;200:39-47.
 23. Fenech M., Crott J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes - evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2002;504:131-6.
 24. Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G.M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology*. 1998;140:1307-20.
 25. Gadhia P.K., Thumbar R.P., Kevadiya B. Cytome Assay of Buccal Epithelium for Bio-monitoring Genotoxic Assessment of Benzene Exposure among Petrol Pump Attendants. *International Journal of Human Genetics*. 2010;10:239-45.
 26. Celik A., Yildirim S., Ekinci S.Y., Tasdelen B. Bio-monitoring for the genotoxic assessment in road construction workers as determined by the buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013;92: 265-70.
 27. Benedetti D., Nunes E., Sarmiento M., Porto C., dos Santos C.E.I., Dias J.F., et al. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013;752: 28-33.
 28. Meyer A.V., Tolochko T.A., Litvin A.V., Minina V.I., Kulemin Y.E. Karyological status of buccal epithelial cells of miners with occupational lung pathologies. *Gigiena i sanitariya*. 2018;97(3): 220-5. (in Russian)
 29. Shimizu N., Kamezaki F., Shigematsu S. Tracking of microinjected DNA in live cells reveals the intracellular behavior and elimination of extrachromosomal genetic material. *Nucleic Acids Research*. 2005; 33: 6296-307.
 30. Brodskii V.I., Uryvaeva I.V. Cell polyploidy, proliferation and differentiation. Moscow: Nauka; 1981. (in Russian)
 31. Yurchenko V.V. Cytogenetic disorders in the human cheek epithelium during exposure to genotoxicants. *Toxicologicheskiy vestnik*. 2005;6:14-21. (in Russian)
 32. Pozharskaja V.V., Petrashova D.A. Cytogenetic disturbances frequency in lymphocytes of the children living in Murman and Moscow regions. *Trudy Kol'skogo nauchnogo tsentra*. 2017; 8: 61-6. (in Russian)
 33. Diler S.B., Celik A. Cytogenetic Biomonitoring of Carpet Fabric Workers Using Micronucleus Frequency, Nuclear Changes, and the Calculation of Risk Assessment by Repair Index in Exfoliated Mucosa Cells. *DNA and Cell Biology*. 2011; 30: 821-7.

Поступила 25.03.19

Принята к печати 29.03.19

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Шахвердиева И.Д., Гулиев М.Р., Нариманова Г.В., Керимова И.А.

ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ В КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ С АНЕМИЕЙ

Азербайджанский медицинский университет, 1022, Баку, Азербайджан

Целью исследования явилось изучение цитокинового профиля в сыворотке крови при анемиях, наблюдаемых в различные сроки беременности. Была исследована венозная кровь 85 беременных пациенток с анемией. У 46 из них была первая беременность (1-ая группа), у 39 (2-ая группа) - повторная беременность. Группу сравнения составили 19 беременных без анемии. У всех обследуемых определяли уровень гемоглобина и сывороточного железа колориметрическим методом, а также содержание цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10 методом иммуноферментного анализа. Результаты исследования показали значительное понижение гемоглобина и сывороточного железа в крови у беременных с анемиями. Выявлено также значительное повышение провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-2 и ИЛ-8 и значительное уменьшение ИЛ-10 по сравнению с данными беременных без анемии. Наиболее выраженные изменения в цитокиновом балансе наблюдались в третьем триместре и при повторной беременности, что вызвано прогрессированием анемии.

Ключевые слова: анемия беременных; метаболизм железа; цитокины.

Для цитирования: Шахвердиева И.Д., Гулиев М.Р., Нариманова Г.В., Керимова И.А. Изменение цитокинового профиля в крови беременных с анемией. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (4): 234-236.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-234-236>

Shahverdiyeva I.J., Guliyev M.R., Narimanova G.V., Kerimova I.A

CHANGES OF CYTOKINE PROFILE IN THE BLOOD OF PREGNANT WOMEN WITH ANEMIA

Department of Biochemistry of Azerbaijan Medical University, Baku

The aim of this study was to investigate the level of serum cytokines in different periods of pregnancy associated with anemia. 85 pregnant patients with anemia were examined. 46 of them were in their first pregnancy (1st group), and 39 (2nd group) patients were in their second or further pregnancy period. The comparison group consisted of 19 pregnant women without anemia. The level of hemoglobin and serum iron were determined by using colorimetric method, as well as the level of cytokines IL-2, IL-6, IL-8 and IL-10 were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay method. The results showed a significant decrease in hemoglobin and serum iron level in the blood of pregnant women with anemia, significant increase in proinflammatory cytokines, such as IL-2 and IL-8, and a significant decrease in IL-10 compared with pregnant women without anemia were also detected. The most pronounced changes in the cytokine profile were observed in the third trimester and during second or further pregnancy, which is caused by the progression of anemia.

Key words: anemia pregnancy; iron metabolism; cytokines.

For citation: Shahverdiyeva I.J., Guliyev M.R., Narimanova G.V., Kerimova I.A Changes of cytokine profile in the blood of pregnant women with anemia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (4): 234-236. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-234-236>

For correspondence: Shahverdiyeva Ilaha Jamshid, researcher of Scientific Research Laboratory at the Department of Biochemistry; e-mail: ilahashahverdiyeva@gmail.com

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 19.01.2019
Accepted 24.01.2019

Введение. Одним из частых осложнений у беременных является анемия, вызванная нарушениями обмена железа [7, 8]. Анемия при беременности может приводить к различным последствиям, среди которых особый интерес вызывают нарушения функционирования иммунной системы [2, 3, 5, 12].

Главным звеном иммунной системы являются цитокины и антимикробные пептиды, которые осуществляют взаимосвязь между различными клетками, в том числе иммунокомпетентными. При беременности продуцируются как про-, так и противовоспалительные цитокины,

баланс которых имеет существенное значение для нормального течения беременности. Важнейшим источником цитокинов и регулятором уровня Т-хелперов (Th-1 и Th-2) являются макрофаги. По данным литературы, при анемиях беременности усиливается экспрессия провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-8 [3, 11]. В макрофагах понижается экспрессия транспортера железа ферропортина, в результате чего подавляется выход железа из макрофагов. В то же время, ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-10 индуцируют экспрессию ферритина, а также стимулируют хранение и накопление железа в макрофагах. В целом эти сложные и до конца неизученные процессы ведут к снижению концентрации железа в циркулирующей крови и в дальнейшем к развитию анемии [5, 6, 10, 11, 13].

Для корреспонденции: Шахвердиева Илаха Джамшид кызы, ст. лаборант НИЛ при каф. биохимии; e-mail: ilahashahverdiyeva@gmail.com

Целью данного исследования является изучение цитокинового профиля в сыворотке крови при анемиях, наблюдаемых в различные сроки беременности.

Материал и методы. Была исследована венозная кровь 85 беременных пациенток с анемией. У 46 из них была первая беременность (1-я группа), у 39 (2-я группа) – повторная (интервал между беременностями 1,5–2 года). Группу сравнения составили 19 беременных без анемии.

Диагноз анемии устанавливался на основании рекомендаций ВОЗ при уровне гемоглобина <110 г/л. Центр контроля заболеваний (США) использует в качестве нижних границ концентрации Нб в I и III триместрах беременности – 110 г/л, во II триместре – 105 г/л. Часто очень трудно определить, обусловлено ли это анемией или гемодилуцией [1]. Средний возраст беременных в исследуемых группах составил 24,6±1,0 года у беременных без анемии, 21,8±0,5 (1-я группа), 26,3±0,6 года (2-я группа) – у беременных с анемией.

Содержание сывороточного железа крови определяли колориметрическим методом с помощью набора реактивов “Human” (Германия) на биохимическом анализаторе Stat Fax 1904+ (США). Концентрацию цитокинов определяли с помощью наборов реагентов «VECTOR BEST» (Российская Федерация) на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 303+ (США). Полученные результаты обработаны статически; были определены средние значения показателей и их средние ошибки; статистическую значимость различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Среднее значение Нб у беременных без анемии составило 113,9±1,6 г/л, у беременных с анемией (первая беременность) в первом триместре – 101,6±1,0 г/л, во втором триместре – 96,1±1,1 г/л, в третьем – 91,4±1,2 г/л (табл. 1).

Согласно полученным результатам, в сыворотке крови у беременных с анемией отмечалось значительное уменьшение содержания железа.

Так, содержание железа у пациенток 1-й группы в первом триместре уменьшалось на 26,3%, во втором триместре – на 48,2% и в третьем триместре – в 2,9 раза по сравнению с группой сравнения (табл. 1).

Наиболее значительное уменьшение железа наблюдалось у беременных с повторной беременностью. У них в первом и во втором триместре содержание железа уменьшалось в 2 раза, в третьем триместре – в 2,8 раза по отношению к результатам беременных без анемии (табл. 2).

Результаты исследования цитокинового профиля отражены в табл. 2. В 1-й группе пациенток содержание провоспалительных цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8) в первом триместре достоверно не отличались от такового в группе беременных без анемии. Однако во втором триместре отмечалось статически достоверное повышение ИЛ-2 на 82,7%, ИЛ-8 на 72,4%. В третьем триместре также отмечена высокая концентрация этих цитокинов: их концентрация в 2 раза превысила показатели в группе сравнения.

В этой группе пациенток выявлено снижение содержания противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в первом триместре на 16,9%, во втором триместре на 24,5%. ИЛ-10 продуцируется Th-1 и Th-2, макрофагами и имеет широкий спектр действия с выраженным иммуносупрессивным эффектом. ИЛ-10 снижает активность Th-1 в большей степени, чем Th-2, так как этот цитокин ингибирует синтез ряда цитокинов, продуцируемых Th1, таких как IFN γ , ИЛ-2, ФНО- β , ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО- α [4, 13].

Как видно из полученных данных, выявлена тенденция к снижению содержания ИЛ-6 недостоверного характера в крови 1-ой группы беременных. Некотор-

Таблица 1

Содержание гемоглобина и сывороточного железа при анемиях в различные сроки беременности (M±m)

Показатели	Беременные без анемии n=19	Беременные с анемиями, триместр					
		Первая беременность, n=46			Повторная беременность, n=39		
		I	II	III	I	II	III
Гемоглобин, г/л	113,9±1,6 (105-127)	101,6±1,0* (86-124)	96,1±1,1* (72-109)	91,4±1,2* (67-110)	96,9±1,6* (72-116)	91,8±1,6* (69-107)	86,9±1,7* (63-103)
СЖ, мкмоль/л	14,31±0,81 (10,6-24,6)	10,55±0,52* (5,1-27)	7,42±0,31* (3,7-10,9)	5,00±0,25* (2,1-7,8)	7,13±0,42* (2,3-11,7)	7,00±0,38* (2,3-11,5)	5,08±0,44* (1-9,4)

Примечание. * - $p < 0,001$ – по сравнению с показателями беременных без анемии.

Таблица 2

Содержание некоторых цитокинов при анемиях (первая беременность) (M±m)

Показатели	Группы			
	Беременные без анемии, n=19	Беременные с анемиями (первая беременность), триместр, n=46		
		I	II	III
ИЛ-2, пг/мл	6,3±0,7 (3,2-10,2)	7,9±1,4* (4,2-24,8)	11,5±1,5** (2-18,3)	12,8±1,8** (3,4-23,6)
ИЛ-6, пг/мл	3,15±0,41 (1,7-5,5)	2,73±0,16* (2,14-4,53)	3,18±0,15** (2,1-3,8)	3,41±0,16*** (2,4-4,1)
ИЛ-8, пг/мл	1,68±0,35 (0,2-3,2)	2,06±0,11** (1,44-2,89)	2,89±0,14*** (2,1-3,6)	3,32±0,18*** (2,2-4,4)
ИЛ-10, пг/мл	6,24±0,52 (4,1-9,2)	5,19±0,15*** (4,37-6,19)	4,71±0,52* (1,7-7,8)	3,27±0,25 (1,9-4,8)

Примечание. ***- $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$; * - $p < 0,05$ - по сравнению с показателями беременных без анемии.

Содержание некоторых цитокинов при анемиях (повторная беременность) (M±m)

Показатели	Группы			
	Беременные без анемии, n=19	Беременные с анемиями (повторная беременность), триместр, n=39		
		I	II	III
ИЛ-2, пг/мл	6,3±0,7 (3,2-10,2)	10,5±1,6** (1,9-17,9)	16,7±1,6*** (7,1-22,9)	22,1±3,9** (3,3-37,8)
ИЛ-6, пг/мл	3,15±0,41 (1,7-5,5)	2,10±0,16* (1,3-3,2)	2,54±0,49 (0,1-5,5)	3,29±0,67 (0,3-7,4)
ИЛ-8, пг/мл	1,68±0,35 (0,2-3,2)	2,41±0,15* (1,7-3,3)	3,48±0,50* (1,3-6,4)	6,48±0,64*** (3,3-9,9)
ИЛ-10, пг/мл	6,24±0,52 (4,1-9,2)	5,01±0,22* (3,6-6,4)	3,92±0,65* (0,9-7,9)	2,87±0,60*** (0,4-5,9)

Примечание. *** – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$; * – $p < 0,05$ – по сравнению с показателями беременных без анемии.

рые провоспалительные цитокины, такие, как ИЛ-1 и ФНО- α , не способны преодолеть плацентарный барьер, но считается, что они способствуют более интенсивному транспорту ИЛ-6 через плаценту, поэтому наблюдается снижение его уровня в сыворотке крови у матери [6, 9].

Наиболее значительные изменения в цитокиновом балансе наблюдались при повторной беременности. Так, в первом триместре уровни ИЛ-2 и ИЛ-8 соответственно на 67,2% и 43,8%, во втором в 2,6 и в 2,1 раза, в третьем триместре в 3,5 и в 3,9 раза статистически достоверно превышали показатели группы беременных пациенток без анемии (табл. 3).

ИЛ-2 играет исключительно важную роль в дифференцировке и пролиферации Т-лимфоцитов, а ИЛ-8 относится к хемокинам и является мощным хемотаксическим и активирующим фактором для нейтрофилов. Повышение уровня этих цитокинов свидетельствует об участии иммунологического компонента в патогенезе анемии [9].

Необходимо отметить, что во 2-й группе беременных, несмотря на значительное снижение уровня ИЛ-6 – на 33,3% в первом триместре, во втором и в третьем триместрах наблюдалась тенденция к ее повышению. При этом уровень этого цитокина в третьем триместре почти достигал значений беременных без анемии. Скорее всего, это связано подготовкой организма к родам и усилением синтеза других провоспалительных цитокинов, которые индуцируют синтез и выход ИЛ-6 [4, 9].

При повторной беременности также наблюдалось снижение концентрации ИЛ-10 по отношению к группе сравнения: в первом триместре на 19,8%, во втором триместре на 37,3%, а в третьем триместре на 54,1%.

Избыточная продукция провоспалительных и снижение уровня противовоспалительных цитокинов при анемии беременности указывает на прогрессирование системного воспаления и снижение механизмов защиты. Повышение уровня провоспалительных цитокинов негативно влияет на эритропоэтин продуцирующие клетки, угнетает пострецепторные пути передачи сигнала в эритроидных клетках [12].

Таким образом, при изучении цитокинового профиля у беременных с анемией выявлено достоверное снижение уровня ИЛ-10 и повышение провоспалительных цитокинов, таких, как ИЛ-2 и ИЛ-8 по сравнению с показателями беременных без анемии. При этом наиболее значительные изменения выявлены при повторной беременности. Полученные результаты указывают на то, что повторная беременность у женщин с анемией имеет более тяжёлое клиническое течение и предусматривает назначение корректирующей терапии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 6–13 см. REFERENCES)

1. Зюбина Л. Ю. Патогенез, клиника, диагностика и лечение висцеральных поражений при железодефицитных состояниях: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Новосибирск; 2000.
2. Лехмус Т. Ю. Комплексная оценка иммунного статуса и HLA антигенного состава клеток крови при эритроидных депрессиях: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Уфа; 1998.
3. Макасария А. Д., Бицадзе В. О., Акиншина С. В. Синдром системного воспалительного ответа в акушерстве. М.: МИА; 2006.
4. Никифорович И. И., Иванян А. Н., Литвинов А. В. Уровень цитокинов у беременных с анемией. *Российский вестник акушер-гинеколога*. 2010; 10(4): 3-5.
5. Сухих Г. Т., Ванько Л. В. Иммунология беременности. М.: Изд-во РАМН; 2003.

REFERENCES

1. Zyubina L. Yu. Pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and treatment of visceral lesions in iron-deficient conditions: Diss. Novosibirsk; 2000. (in Russian)
2. Lechmus T. Yu. Comprehensive assessment of the immune status and HLA antigenic composition of blood cells in erythroid depressions: Diss. Ufa; 1998. (in Russian)
3. Makatsariya A. D., Bitsadze B. O., Akinshina S. V. Syndrome of systemic inflammatory response in obstetrics. Moscow: MIA; 2006. (in Russian)
4. Nikiforovich I. I., Ivanyan A. N., Litvinov A. V. Cytokine levels in pregnant women with anemia. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2010; 10 (4): 3-5. (in Russian)
5. Sukhikh G. T., Vanko L. V. Pregnancy immunology [Immunologiya beremennosti]. Moscow: Izdatelstvo RAMN; 2003. (in Russian)
6. Bergman M, Bessler H, Salman H, Siomin D, Straussberg R, Djaldetti M. In vitro cytokine production in patients with iron deficiency anemia. *Clin. Immunol.* 2004; 113: 340-4.
7. Dama M., Van Lieshout R. J., Mattina G., Steiner M. Iron Deficiency and Risk of Maternal Depression in Pregnancy: An Observational Study. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2018, 40(6): 698–703.
8. Froessler B., Gajic T., Dekker G., Hodyl N. A. Treatment of iron deficiency and iron deficiency anemia with intravenous ferric carboxymaltose in pregnancy. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2018; 298(1): 75–82.
9. Sipahi T., Akar N., Egin Y., Cin S. Serum interleukin-2 and interleukin-6 levels in iron deficiency anemia. *Pediatrics, Hematology, Oncology*. 1998; 15: 69-73.
10. Sobhani S. A., Mirani S., Etaati Z., Naderi N. The association between iron status and some immunological factors in the pregnancy. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 2015; 9(3): 251-2.
11. Speer E. M., Gentile D. A., Zeevi A. et al. Role of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes in spontaneous preterm delivery. *Human Immunology*, 2006; 67 (11): 915-23.
12. Urado R. L. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin. Infect. Dis.* 1997; 25: 888 – 95.
13. Ying C Cheong, William L Ledger. Cytokines in health and disease. *The Obstetrician & Gynaecologist*. 2003; 5: 155-9.

Поступила 19.01.19

Принята к печати 24.01.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Бочкарева С.С.¹, Караулов А.В.^{1,2}, Алешкин А.В.¹, Новикова Л.И.¹, Федорова И.М.¹,
Бляхер М.С.¹, Котелева С.И.¹, Капустин И.В.¹

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ НЕКОТОРЫХ ПАРАМЕТРОВ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА БАКТЕРИОФАГИ

¹ ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ, 119146, Москва, Россия

Цель исследования заключалась в отработке методических подходов, позволяющих оценивать основные параметры гуморального и клеточного иммунного ответа на бактериофаг с учетом многофакторных аспектов его взаимодействия как с возбудителем, так и с макроорганизмом. Получены необходимые реагенты и сконструирована линейка диагностических тест-систем, позволяющих полуколичественно оценивать концентрацию IgG-антител к бактериофагам в сыворотке крови или других биологических жидкостях человека, а также в препаратах, полученных из крови человека, методом ИФА. Доказана необходимость обязательного проведения также реакции нейтрализации, т.е. определения влияния выявленных антител на активность фага в отношении бактерии-мишени. Апробация использованных методических подходов при исследовании сывороток крови пациентов продемонстрировала, что синтезирующиеся при фаготерапии антитела к бактериофагам не всегда являются нейтрализующими. Отработаны методические подходы к оценке реакции клеточного иммунитета на бактериофаг по выявлению Т-лимфоцитов (Т-хелперов и цитолитических Т-лимфоцитов), способных активироваться в присутствии исследуемого фага (по экспрессии раннего маркера активации (CD69) и по способности продуцировать ИФН γ). Апробация методики при исследовании лимфоцитов у пациентов на фоне фаготерапии продемонстрировала наличие активированных клеток как по экспрессии CD69, так и по продукции ИФН γ , динамика которых зависела от сроков проведения и кратности терапии. Появление нейтрализующих антифаговых антител и соответствующих активированных Т-лимфоцитов необходимо учитывать при фаготерапии, эффективность которой может напрямую зависеть не только от активности фага в отношении бактерии-мишени, но и от ответа иммунной системы пациента на бактериофаг.

Ключевые слова: бактериофаги; IgG-антитела; гуморальный иммунитет; клеточный иммунитет; нейтрализующие антифаговые антитела; лимфоциты.

Для цитирования: Бочкарева С.С., Караулов А.В., Алешкин А.В., Новикова Л.И., Федорова И.М., Бляхер М.С., Котелева С.И., Капустин И.В. Методические подходы к оценке некоторых параметров гуморального и клеточного иммунного ответа на бактериофаги. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64 (4): 237-242
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-237-242>

Bochkareva¹ S.S., Karaulov A.V.^{1,2}, Aleshkin A.V.¹, Novikova L.I.¹, Fedorova I.M.¹, Blayaher M.S.¹, Koteleva S.I.¹, Kapustin I.V.¹

APPROACHES TO THE ESTIMATION OF SOME PARAMETERS OF HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSE TO BACTERIOPHAGES

¹G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119146, Moscow, Russia.

The aim of the study was to develop some approaches to evaluate the basic parameters of the humoral and cellular immune response to a bacteriophage, taking into account the multifactorial aspects of its interaction with both the pathogen and the macroorganism. The necessary reagents were obtained and a line of diagnostic ELISA test systems was designed to allow semi-quantitative assessment of the anti-bacteriophage IgG-antibody level in serum or other biological human fluids, as well as in preparations obtained from human blood. The need for neutralization reaction to determine the effect of detected antibodies on phage activity against a target bacterium has been proven. Testing the approaches used in the investigation of patients' blood sera showed that antibodies to bacteriophages synthesized during phage therapy are not always neutralizing. Also approaches have been developed to evaluate cell immunity reactions to bacteriophage namely to identify T-lymphocytes (T-helpers and cytotoxic lymphocytes) that can be activated in the presence of the phage under study (by expressing the early activation marker (CD69) and by the ability to produce IFN γ). Aprobation of the technique in the study of lymphocytes in patients during phage therapy showed the presence of activated cells by both the CD69 expression and IFN γ production, the dynamics of which depended on the timing and frequency of therapy. The appearance of neutralizing anti-phage antibodies and corresponding activated T-lymphocytes should be taken into account in phage therapy, the effectiveness of which can directly depend not only on the activity of the phage against the target bacterium, but also on the response of the patient's immune system to the bacteriophage.

Key words: bacteriophages; IgG-antibodies; humoral immunity; cellular immunity; neutralizing anti-phage antibodies; lymphocytes.

For citation: Bochkareva S.S., Karaulov A.V., Aleshkin A.V., Novikova L.I., Fedorova I.M., Blayaher M.S., Koteleva S.I., Kapustin I.V. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (4): 237-242 (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-237-242>

For correspondence: Bochkareva Svetlana Sergeevna, senior researcher, laboratory of immunobiological preparations; e-mail: cip1989@gmail.com

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 25.03.2019

Accepted 03.04.2019

Для корреспонденции: Бочкарева Светлана Сергеевна, ст. науч. сотр. лаб. иммунобиологических препаратов; e-mail: cip1989@gmail.com

Введение. Несмотря на то, что исследования бактериофагов проводятся длительное время, в мире насчитывается крайне мало исследовательских центров, использующих фаги в качестве лечебных средств терапии инфекций у людей. Взаимодействие между препаратами фагов и иммунной системой человека стало предметом исследования лишь в последние годы. Имеются данные по изучению антифагового иммунитета в популяции здоровых людей [6]. Обнаружено, что резидентная микрофлора, колонизирующая кишечник человека, в обязательном порядке включает и вирусы (микробиота и вириобиота) [9]. Бактериофаги являются компонентами вириобиоты. Полагают, что кишечник человека содержит около 10^{15} бактериофагов (так называемый «фагеом»), что выше, чем общее содержание в нем микроорганизмов. С помощью современных методов исследования выявлена исключительная микробиологическая обратимость экосистемы кишечника, включая бактериофаги как элементы этой системы [8]. В настоящее время, как в эксперименте, так и на клиническом материале, показано, что введение млекопитающим, в том числе и человеку, бактериофагов, направленных против тех или иных бактерий, активирует в их организме реакции врожденного иммунитета [17], а также сопровождается появлением в кишечнике или в крови антител, направленных против данных бактериофагов [10, 17, 19]. Фаги, присутствующие в кишечнике, могут индуцировать выработку соответствующих антител по доза-зависимому типу при достаточно длительной экспозиции. Если фаг слабо иммуногенен, то только очень высокие его дозы при длительном времени экспозиции могут привести к значимому увеличению специфических иммуноглобулинов в крови [15]. Проведение эффективной фаготерапии требует не только мониторинга специфических антител, но и оценки наличия или отсутствия у выявленных антител нейтрализующего действия на бактериофаг. Кроме того, по мнению ряда авторов, даже выраженный гуморальный ответ на фаги не исключает хорошего эффекта фаготерапии [6, 7, 16].

Действительно, фаги, как и другие вирусы, потенциально способны к взаимодействию с иммунной системой человека. Например, в экспериментах *in vitro* показано, что фаги могут ингибировать активацию и пролиферацию Т-клеток, но механизм этого эффекта до сих пор не установлен [3]. Показано также, что этот процесс сопровождается увеличением количества фагоспецифических В-лимфоцитов и плазматических клеток [10]. Характер и динамика активации Т-лимфоцитов в процессе формирования иммунного ответа на бактериофаги изучены значительно меньше [12]. Совокупность данных о сроках появления активированных клеток, длительности их циркуляции в крови, динамике выработки антител, направленных против бактериофага, в конечном итоге будет определять параметры проведения эффективной фаготерапии при многократных курсах.

Материал и методы. Для отработки методики определения иммунного ответа были использованы сыворотки крови интактных и иммунизированных кроликов, сыворотки крови и выделенные лимфоциты здоровых добровольцев и пациентов, получавших фаготерапию, препараты, полученные из плазмы крови.

В работе были использованы бактериофаги, лизирующие *Paeruginosa* (PA5 – порядок *Caudovirales*, семейство *Myoviridae*, род *Pbunavirus*, регистрационный номер в GenBank KY000082.1; PA10 – порядок

Caudovirales, семейство *Myoviridae*, род *Pakpunavirus*, регистрационный номер в GenBank KY000083.1; PAV1805 – является предметом интеллектуальной собственности; PA1C – порядок *Caudovirales*, семейство *Myoviridae*, род *Phikzvirus*, регистрационный номер в GenBank MK599315), *A.baumannii* (AP22 – порядок *Caudovirales*, семейство *Myoviridae*, род *Ap22virus*, регистрационный номер в GenBank NC_017984.1; AM24 – порядок *Caudovirales*, семейство *Myoviridae*, регистрационный номер в GenBank KY000079.1), *S.aureus* (SCH1 – порядок *Caudovirales*, семейство *Podoviridae*, подсемейство *Picovirinae*, род *P68virus*, регистрационный номер в GenBank KY000084.1; SCH111 – порядок *Caudovirales*, семейство *Podoviridae*, подсемейство *Picovirinae*, род *P68virus*, регистрационный номер в GenBank KY000085.1), *K.pneumoniae* (KPV9024, KPS3 – являются предметами интеллектуальной собственности; KPV811 – порядок *Caudovirales*, семейство *Podoviridae*, подсемейство *Autographivirinae*, род *Kp34virus*, регистрационный номер в GenBank KY000081.1; KPV15 – порядок *Caudovirales*, семейство *Myoviridae*, подсемейство *Tevenvirinae*, род *Jd18virus*, регистрационный номер в GenBank KY000080.1).

Получение кроличьих поликлональных моноспецифических антисывороток к бактериофагам и выделение из них иммуноглобулиновых фракций (использовались в качестве положительного контроля при определении антифаговых антител). Для получения антисывороток к бактериофагам проводили цикл внутримышечных иммунизаций кроликов, состоящий из нескольких (более 3) инъекций соответствующим бактериофагом в физиологическом растворе (концентрация фага 10^8 - 10^{10} БОЕ/мл), смешанным с полным или неполным адьювантом Фрейнда. Иммуноглобулиновую фракцию (Ig-фракцию) выделяли согласно [11].

Иммунохимическая характеристика кроличьих поликлональных моноспецифических антисывороток и выделенных из них иммуноглобулиновых фракций. Использовали метод иммунопреципитации по Оухтерлони [1].

Конструирование иммуноферментной тест-системы для определения антифаговых IgG-антител и проведение иммуноферментного анализа. Антиген (бактериофаг) сорбировали в лунках полистиролового планшета, затем в лунки вносили исследуемый образец, связавшиеся с антигеном IgG-антитела выявляли с помощью конъюгата Protein A-Peroxidase (Sigma, США), а ферментная реакция с добавленным затем субстратом ТМБ (BCM Diagnostics, США) ингибировалась кислотой (стоп-реагент). Регистрировали оптическую плотность в лунках при 450 нм. Положительным контролем служила кроличья антисыворотка к бактериофагу, заведомо содержащая соответствующие антитела, или иммуноглобулиновая фракция антисыворотки, отрицательным контролем – физиологический раствор и сыворотка интактного кролика. Для исключения неспецифической сорбции образцов их вносили также в лунки, не содержащие фаги (так называемые «пустые лунки»). Выбор конъюгата был обусловлен способностью Protein A взаимодействовать с IgG как человека, так и разных видов животных, в частности, кроликов. Ввиду различных физико-химических и биологических свойств бактериофагов были подобраны условия их сорбции как антигенов в лунках планшета (концентрация фагов 10^8 - 10^{11} БОЕ/мл, длительность сорбции в лунках 18-30 ч, темпе-

ратура сорбции +4-8°C). Были также подобраны условия проведения иммуноферментной реакции (концентрации компонентов реакции, температура и длительность этапов инкубации, необходимость встряхивания содержимого планшета во время инкубации). Реакция считалась положительной при достижении оптической плотности, в два раза превышающей оптическую плотность отрицательного контроля (физиологический раствор).

В случае обнаружения в образцах сыворотки крови антифаговых IgG-антител проводили реакцию нейтрализации, позволяющую оценить нейтрализующие свойства этих антител в отношении бактериофагов.

Реакция нейтрализации. Проводили для определения нейтрализующей антифаговой активности выявленных антител согласно [13]. Соответствующую сыворотку крови разводили в 1500 раз в забуференном фосфатами физиологическом растворе (ЗФР) во избежание неспецифической реакции. Затем разведенную сыворотку смешивали с фаголизатом исследуемого бактериофага. Полученную смесь инкубировали в течение 30 минут при 37°C и после инкубации титровали по методу Грация [9]. В контрольном опыте сыворотку не добавляли. Снижение титра бактериофага в смеси с сывороткой крови по сравнению с контролем свидетельствовало о наличии антител, обладающих нейтрализующей антифаговой активностью.

Стимуляция лимфоцитов бактериофагами. Лимфоциты, выделенные из крови центрифугированием в градиенте плотности, вносили в лунки культурального планшета (2,5-3x10⁵ на лунку) и культивировали в присутствии бактериофага в течение 20 ч (37°C, 5% CO₂). Доза бактериофага варьировала от 10⁴ до 10⁷ БОЕ в лунке. В контрольную пробу вносили буфер, используемый на финальной стадии подготовки бактериофага. После культивирования из лунок отбирали супернатанты (для определения в них концентрации ИФН γ или любого другого цитокина) и лимфоциты (для проточной цитометрии).

Оценка продукции цитокинов, индуцированной бактериофагом. В супернатантах (методом ИФА) определяли концентрацию ИФН γ с помощью тест-системы ЗАО Вектор-Бест (Россия).

Оценка активированных бактериофагом Т-лимфоцитов. Методом проточной цитометрии определяли процент активированных Т-хелперов и цитолитических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Применялась трехцветная флуоресцентная метка и следующие комбинации моноклональных антител (Beckman Coulter, США): CD3/CD4/CD69 (FITC/PE/PC7) и CD3/CD8/CD69 (FITC/PE/PC5). Активацию Т-лимфоцитов регистрировали по увеличению среди них количества клеток, экспрессирующих маркер активации CD69. Минимальный прирост показателя, который расценивался как отчетливый признак активации, составлял 2 %.

Результаты и обсуждение. Основным методическим подходом к изучению возможного гуморального ответа на бактериофаги является определение соответствующих антифаговых антител, причем именно IgG-антитела могут служить маркерами такого ответа. В отсутствие коммерчески доступных диагностических систем необходимо было сконструировать тест-системы, позволяющие полуколичественно оценивать наличие в исследуемом образце IgG-антител к тем или иным фагам методом ИФА. Элементами разработанных тест-систем являлись бактериофаги, исследуемые образцы (сыворотка крови

или любая биологическая жидкость), конъюгат Protein A-Peroxidase, положительный (заведомо содержит антитела) и отрицательный (не содержит антитела) образцы. Положительным контролем служили кроличьи поликлональные моноспецифические антисыворотки к фагам и выделенные из них иммуноглобулиновые фракции (Ig-фракции).

Кроличьи антисыворотки, полученные в результате иммунизации бактериофагами PA5, KPВ9024, AP22, SCH1, лизирующими, соответственно, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *S.aureus*, и выделенные из них Ig-фракции были проанализированы методом иммунопреципитации по Оухтерлони. Линии преципитации свидетельствовали о наличии антител к соответствующим антигенам (бактериофагам) (рис. 1 см. обложку).

На примере фагов, лизирующих *S.aureus* и *K.pneumoniae*, и соответствующих антисывороток, показано, что антисыворотки строго специфичны. При взаимодействии бактериофагов SCH1 и KPВ9024 с антисыворотками, полученными в результате иммунизации другими бактериофагами, линии преципитации отсутствовали (рис. 2 см. обложку).

Важным аспектом оценки антифагового гуморального иммунитета является не только обнаружение специфических антител, но и выяснение вопроса о том, являются ли эти антитела нейтрализующими фаговую активность в отношении бактерии-мишени, что определяется в реакции нейтрализации. При исследовании в реакции нейтрализации кроличьих антифаговых сывороток было обнаружено, что инкубация фагов с соответствующими антисыворотками приводила к значительному ослаблению (в 100 раз в случае фагов AP22 и SCH1) или даже полному отсутствию (в случае фага PA5) лизиса бактерий, а в случае с фагом KPВ9024 нейтрализующая активность антисыворотки отсутствовала. Таким образом, было выявлено, что образовавшиеся антитела необязательно обладают свойством нейтрализовать антибактериальную активность фага, что может иметь принципиальное значение при проведении фаготерапии у больных, особенно при повторных курсах.

Полученные кроличьи антифаговые антисыворотки были исследованы методом ИФА с помощью сконструированных тест-систем. В качестве примера в табл. 1 представлены значения оптической плотности при разных разведениях сывороток, полученных при иммунизации фагами PA5 и AP22, и выделенных из них Ig-фракций. Видно, что разведение до 1:6400 кроличьей антисыворотки к PA5 и соответствующей Ig-фракции и до 1:3200 – антисыворотки к AP22 и ее Ig-фракции – давало оптическую плотность около 0,30, т.е. регистрировалась положительная реакция. В то же время сыворотка неиммунизированного (интактного) кролика не вызывала появления окрашивания (оптическая плотность на уровне отрицательного контроля – 0,1). Не развивалось окрашивание также в «пустых лунках» (без фага), что подтверждает также и специфический характер реакции при наличии в иммуноферментной системе всех необходимых элементов (антиген-антитело-конъюгат-субстрат).

Сконструированные тест-системы были апробированы при анализе уровня IgG-антител к бактериофагам (AP22 и PA5) в препаратах, полученных из крови человека – «Габриглобине» (внутривенный иммуноглобулиновый препарат) и «Комплексном иммуноглобулиновом препарате» (предназначен для перорального применения). Титр антител не превышал 1:64 [5]. Наличие анти-

Таблица 1

Выраженность иммуноферментной реакции при анализе кроличьих антисывороток к бактериофагам PA5 и AP22 и выделенных из них Ig-фракций по сравнению с сывороткой крови неиммунизированного кролика (в ед. оптической плотности)

Разведение а/с и Ig-фракции	Оптическая плотность, Ед				Сыворотка крови неиммунизированного кролика
	PA5		KV9024		
	а/с	Ig-фракция	а/с	Ig-фракция	
Без разведения	0,89	0,88	0,69	0,81	0,1
1:100	0,99	0,94	0,86	0,82	-
1:200	0,94	0,83	0,75	0,79	-
1:400	0,84	0,79	0,63	0,74	-
1:800	0,81	0,78	0,47	0,64	-
1:1600	0,61	0,66	0,32	0,50	-
1:3200	0,53	0,53	0,27	0,35	-
1:6400	0,30	0,32	0,18	0,23	-
1:12800	0,16	0,16	0,13	0,13	-

Таблица 2

Наличие антифаговых антител в сыворотке крови пациентов, получавших различные бактериофаги в течение одного или нескольких курсов

Курсы	Применяемые в терапии бактериофаги							
	фаги, лизирующие <i>P.aeruginosa</i>		фаги, лизирующие <i>A.baumannii</i>		фаги, лизирующие <i>S.aureus</i>		фаги, лизирующие <i>K.pneumoniae</i>	
	Методы определения специфических антифаговых антител в сыворотке крови больных							
	ИФА	р-ция нейтрал.	ИФА	р-ция нейтрал.	ИФА	р-ция нейтрал.	ИФА	р-ция нейтрал.
Первичный	+	+	+	+	+	+	-	-
Повторные	+	+	+	+	+	+	+/-*	-

Примечание. * – в зависимости от способа введения бактериофага.

тел такой специфичности в препаратах, полученных из донорской крови, свидетельствует об определенной напряженности антифагового иммунитета в популяции, что согласуется с данными литературы [6,14].

Сконструированные тест-системы были апробированы также при анализе антифагового гуморального иммунитета у пациентов отделения реанимации, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (табл. 2). Было обнаружено, что внутрижелудочный (через зонд) прием бактериофагов, лизирующих *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *S.aureus*, уже через 2–3 недели приводит к появлению антифаговых IgG-антител в различных титрах (1:16-1:4096), причем доказана их нейтрализующая активность. При использовании бактериофагов, лизирующих *K.pneumoniae*, методом ИФА антитела были зафиксированы у пациентов, получавших фаг путем сочетанного внутрижелудочного введения через зонд и инстилляций в инфицированный локус. Однако нейтрализующей активности у данных антител обнаружено не было. При всех иных местных способах введения фагов, лизирующих *K.pneumoniae*, как при первичном, так и при повторных курсах, специфические антитела у пациентов не выявлялись.

При фаготерапии можно ожидать и реакции клеточного иммунитета больного на используемый фаг как на вирусную частицу. Исследование этого феномена тре-

бует выбора соответствующих методических подходов. Широко распространен метод, позволяющий выявлять активированные, способные распознавать исследуемые антигены, Т-лимфоциты по экспрессии на них раннего маркера активации (CD69) и по их способности продуцировать ИФН γ [2,19], но для каждого вида антигенов требуется отработка технических деталей. В качестве апробации использованного подхода к оценке параметров антифагового ответа клеточного звена иммунитета на выраженность экспрессии CD69 и способность к продукции ИФН γ были исследованы лимфоциты, полученные от здоровых добровольцев, пациентов, получающих фаготерапию впервые, и пациентов, проходящих повторные курсы фаготерапии. Образцы лимфоцитов от больных были получены в динамике фаготерапии (до введения каких-либо фагов, через 2 недели и через 6 недель после введения – перед началом следующего курса фаготерапии).

Результаты эксперимента по подбору дозы бактериофага при оценке количества активированных лимфоцитов представлены в табл. 3. Высокие дозы бактериофагов (10^7 - 5×10^7 БОЕ/мл) вызывали активацию клеток даже у здоровых лиц, никогда не имевших контакта с фагами, в 100% случаев. Промежуточная доза 5×10^6 БОЕ/мл активировала лимфоциты в 44% случаев, а доза 10^6 БОЕ/мл не вызывала активации лимфоцитов у здоровых лиц

Таблица 3

Среднее увеличение количества активированных (CD69+) Т-хелперов и ЦТЛ среди лимфоцитов здоровых людей, стимулированных *in vitro* разными дозами бактериофагов (БОЕ/мл)

Субпопуляция лимфоцитов крови	Прирост (%) активированных CD69+ при дозе бактериофага			
	10 ⁶	5x10 ⁶	10 ⁷	5x10 ⁷
Т-хелперы CD3+CD4+	0,8	2,2	3,6	9,7
ЦТЛ CD3+CD8+	1,8	5,7	7,3	5,6

Таблица 4

Результаты проточной цитометрии по выявлению активации лимфоцитов у пациентов при первичном и повторном курсах фаготерапии

Курс фаготерапии		Диапазон прироста (%) CD69+клеток при стимуляции бактериофагом <i>in vitro</i>		
		до лечения	через 2 недели	через 3 недели
первичный	среди Т-хелперов	0,1 - 0,7	1,2 - 2,7	1,6 - 1,9
	среди ЦТЛ	0,5 - 2,1	0,4 - 5,6	0,2 - 6,3
повторный	среди Т-хелперов	0,1 - 4,2	10,6 - 12,3	4,7 - 8,3
	среди ЦТЛ	5,8 - 7,6	7,5 - 10,0	6,8 - 7,8

и была в дальнейшем использована для анализа активированных лимфоцитов у больных.

Предполагалось, что активация лимфоцитов в ответ на дозу фага 10⁶ БОЕ/мл и одновременное отсутствие активации «посторонним» бактериофагом будет указывать на присутствие в крови пациента антигенспецифических Т-лимфоцитов.

Результаты исследования лимфоцитов больных на фоне фаготерапии представлены в табл. 4. Перед началом первого курса фаготерапии в крови пациентов не выявлялись Т-лимфоциты, способные активироваться в присутствии бактериофагов. Однако, через 2 и через 3 недели ЦТЛ, активирующиеся в присутствии бактериофага, применяемого для терапии, обнаруживались у 90% больных и, напротив, Т-хелперы активировались только у 14%.

В культурах лимфоцитов крови пациентов, обследованных до начала повторной фаготерапии, получавших повторные курсы тем же фагом, активация ЦТЛ бактериофагом *in vitro* выявлялась в 100%, а Т-хелперов – в 66%. Через 2 и 3 недели после повторного курса у всех больных из этой подгруппы бактериофагом активировались обе субпопуляции Т-лимфоцитов.

Приведенные результаты показывают, что увеличение количества Т-лимфоцитов с иммунофенотипом CD69+ при их культивировании с бактериофагом, примененным для лечения, может служить признаком того, что в крови человека циркулируют Т-клетки, специфически распознающие данный фаг. Не весь наблюдаемый прирост CD69+ Т-хелперов и ЦТЛ обеспечивался антигенспецифическими клетками, но различие в ответе одной и той же культуры лимфоцитов на разные виды фагов, позволяет считать, что запускается этот процесс специфическими Т-лимфоцитами.

Антигенная активация Т-лимфоцитов может быть выявлена также по увеличению продукции ими ИФН γ [2]. При изучении фаг-опосредованной стимуляции выработки ИФН γ необходимо было подобрать дозу бактериофага, а также выбрать граничное значение показателя, при превышении которого эффект активации может быть с уверенностью зарегистрирован.

В группе здоровых людей, не контактировавших ра-

нее с примененными в исследовании различными бактериофагами, стимуляция лимфоцитов крови высокими дозами фага (10⁷ - 5x10⁷ БОЕ/мл) вызывала повышение продукции ИФН γ этими клетками на 50-340 пг/мл. При дозе бактериофага 5x10⁶ БОЭ/мл в 33% образцов наблюдалось повышение концентрации более чем на 50 пг/мл, а при дозе 10⁶ БОЭ/мл – ни в одном образце лимфоцитов, полученном от здоровых лиц, активация не превышала 50 пг/мл (в среднем она составляла 26 пг/мл). Таким образом, доза бактериофага 10⁶ БОЕ/мл была признана оптимальной для обследования больных, а 50 пг/мл ИФН γ – граничным значением для эффекта антигенной активации.

Изучение фаг-опосредованной стимуляции выработки ИФН γ лимфоцитами больных, получавших фаготерапию, продемонстрировало, что до начала лечения практически не выявлялось повышения секреции ИФН γ (1,5–9,4 пг/мл). Значимый прирост концентрации ИФН γ после первичного курса фаготерапии (54–240 пг/мл) начинал регистрироваться не ранее срока в 2 нед или даже через 4–5 недель.

Заключение. Были отработаны подходы к оценке ответа иммунной системы (ее гуморального и клеточного звена) на введение бактериофагов человеку. Оценка гуморального ответа заключается в выявлении антител к бактериофагам и определения их нейтрализующей активности. Оценка клеточного ответа состоит в выявлении Т-лимфоцитов, способных распознавать антигены бактериофага, примененного для фаготерапии. Предложенные *in vitro* методики позволят получить информацию о том, развивается или нет иммунный ответ на конкретный бактериофаг при проведении фаготерапии, в какие сроки после начала лечения появляются соответствующие антитела и активированные клетки и насколько длительно они циркулируют в крови, что в случае снижения эффективности терапии позволит скорректировать штаммовый состав препаратов бактериофагов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–19 см. REFERENCES)

1. Иммунологические методы. Фримель Г., ред. М.: Медицина; 1987.
2. Луцкий А.А., Жирков А.А., Лобзин Д.Ю., Рао М., Алексеева Л.А., Мейер М. и др. Интерферон- γ : биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа. *Журнал Инфектологии*. 2015; 7 (4): 10-22.

REFERENCES

1. Immunological methods [Immunologicheskie metody]. Frimel G., ed. Moscow: Meditsina; 1987. (in Russian)
2. Lutskii A.A., Zhirkov A.A., Lobzin D.Yu., Rao M., Alekseeva L.A., Meier M. et al. Interferon- γ : biological function and significance for the diagnosis of cellular immune response. *Zhurnal infektologii*. 2015; 7 (4): 10-22. (in Russian)
3. Avgustin B., Kotnik V., Skoberne M., Malovrh T., Skralovnik-Stern A., Tercej M. CD69 expression on CD4+ T lymphocytes after in vitro stimulation with tuberculin is an indicator of immune sensitization against Mycobacterium tuberculosis antigens. *Clin. diagn. lab. immunol.* 2005; 12 (1): 101–6.
4. Bacteriophages: Biology and Application. Kutter E., Sulakvelidze A., eds. CRC Press, Boca Raton, FL.; 2005.
5. Bochkareva S.S., Aleshkin A.V., Ershova O.N. et al. Anti-phage antibody response in phage therapy against healthcare-associated infections (HAIs). *Infektsionnye Bolezni*. 2017; 15(1): 35-40.
6. Bruttin A, Brussow H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005; 49 (7): 2874-8.
7. Dąbrowska K., Miernikiewicz P., Piotrowicza A. et al. Immunogenicity studies of proteins forming the t4 phage head surface. *Journal of Virology*. 2014; 8 (21): 12551-7.
8. Dalmaso M, Hill C, Ross RP. Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends Microbiol*. 2014; 22 (7): 399-405.
9. Duerkop B. A., Hooper L. V. Resident viruses and interaction with the immune system. *Nat. immunol.* 2013; 14 (7): 654-9.
10. Henry K.A., Murira A., Van Houten N. E., Scot J. K. Developing strategies to enhance and focus humoral immune responses using filamentous phage as a model antigen. *Bioengineered Bugs*. 2011; 2 (5) 275-83.
11. Hudson L., Hay F.C. Practical immunology. Blackwell Scientific, Oxford, 1976.
12. Kim K.P., Cha J.D., Jang E.H., Klumpp J., Hagens S., Hardt W.D. et al. PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immuneresponse. *Microb Biotechnol*. 2008; 1(3): 247-57.
13. Lanni F., Lanni Y. T. Antigenic structure of bacteriophage. *Cold Spring Harb Symp. Quant Biol*. 1953; 18: 159-68.
14. Łusiak-Szelachowska M., Zaczek M., Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Kłak M., Fortuna W., et al. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral Immunology*. 2014; 27 (6): 295-304.
15. Majewska J., Beta W., Lecion D., Hodyra-Stefaniak K., Kłopot A., Kaźmierczak Z. et al. Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood. *Viruses*. 2015; 7(8): 4783-99.
16. Pescovitz M.D., Torgerson T.R., Ochs H.D., Ocheltree E., McGee P., Krause-Steinrauf H. et al. Effect of rituximab on human in vivo antibody immune responses. *Journal allergy clinical immunology*. 2011; 6: 1295-1302.
17. Van Belleghem J.D., Dąbrowska K., Vaneechoutte M., Barr J. J., Bollyky P.L. Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System. *Viruses*. 2019; 11 (1): 10.
18. Won D. I., Park J. R. Flow cytometric measurements of TB-specific T cells comparing with QuantiFERON-TB Gold. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*. 2010; 78(2): 71–80.
19. Zaczek M., Łusiak-Szelachowska M., Jończyk-Matysiak E., Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Owczarek B. et al. Antibody Production in Response to Staphylococcal MS-1 Phage Cocktail in Patients Undergoing Phage Therapy. *Front Microbiol*. 2016; 24 (7): 1681.

Поступила 25.03.19

Принята к печати 03.04.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Логинава М.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Черанев В.В., Парамонов И.В.

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ HLA-АЛЛЕЛЕЙ И ГАПЛОТИПОВ В ПОПУЛЯЦИИ КАЛМЫКОВ

ФГБУН Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА России, 610027, Киров, Россия

*Проведено высокоразрешающее HLA-типирование локусов HLA-A, -B, -C, -DRB1 и -DQB1 методом массового параллельного секвенирования у 150 проживающих на территории Республики Калмыкия потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток. В оценке популяции калмыков идентифицировано 4 новых аллеля, ранее не зарегистрированные международным Комитетом по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ. В ходе проведенных исследований выявлено 29 аллелей по локусу HLA-A, 44 – по локусу HLA-B, 26 – по локусу HLA-C, 15 – по локусу DQB1, 37 – по локусу HLA-DRB1. Частотой встречаемости более 10% обладают следующие аллели: HLA-A*02:01 (11,7%), HLA-A*01:01 (11%), HLA-B*51:01 (10,3%), HLA-B*58:01 (10,3%), HLA-C*06:02 (17,7%), HLA-C*03:04 (10,3%), HLA-C*03:02 (10%), HLA-DQB1*03:01 (26,7%), HLA-DQB1*02:02 (10%), HLA-DRB1*07:01 (11,7%). Наиболее часто встречающимся HLA-A-B-C-DQB1-DRB1 гаплотипом является A*02:05-B*50:01-C*06:02-DQB1*02:02-DRB1*07:01 (3,7%). Отклонения от закона Харди – Вайнберга не выявлены.*

Ключевые слова: популяция калмыков; HLA-типирование; новые аллели; гаплотипы; высокопроизводительное секвенирование.

Для цитирования: Логинава М.А., Кутявина С.С., Смирнова Д.Н., Черанев В.В., Парамонов И.В. Особенности распределения HLA-аллелей и гаплотипов у калмыков. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (4): 243-249
DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-243-249>

Loginova M.A., Kutyavina S.S., Smirnova D.N., Cheranov V.V., Paramonov I.V.

FEATURES OF DISTRIBUTION HLA-ALLELES AND HAPLOTYPES IN KALMYKS

FSBIS Kirov scientific-research institute of hematology and blood transfusion of FMBA of Russia, Kirov, 610027, Russian Federation

*Conducted high-resolution HLA-typing loci HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 by massively parallel sequencing of 150 potential donors of hematopoietic stem cells from the Republic of Kalmykia. In the studied population, four new alleles identified that not previously registered by the International Committee on the Nomenclature of Factors of the HLA-system of WHO. During the HLA-typing identified: 29 alleles at the HLA-A locus, 44 - at the HLA-B locus, 26 - at the HLA-C locus, 15 - at the DQB1 locus, 37 - at the HLA-DRB1 locus. The following alleles have a frequency of more than 10%: HLA-A*02:01 (11,7%), HLA-A*01:01 (11%), HLA-B*51:01 (10,3%), HLA-B*58:01 (10,3%), HLA-C*06:02 (17,7%), HLA-C*03:04 (10,3%), HLA-C*03:02 (10%), HLA-DQB1*03:01 (26,7%), HLA-DQB1*02:02 (10%), HLA-DRB1*07:01 (11,7%). The most common HLA-A-B-C-DQB1-DRB1 haplotype is A*02:05-B*50:01-C*06:02-DQB1*02:02-DRB1*07:01 (3,7%). Deviations from the Hardy - Weinberg equilibrium not identified.*

Key words: kalmyks, HLA-typing, new alleles, haplotypes, high performance sequencing.

For citation: Loginova M.A., Kutyavina S.S., Smirnova D.N., Cheranov V.V., Paramonov I.V. Features of distribution HLA-alleles and haplotypes in Kalmyks. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64(4): 243-249 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-243-249>

For correspondence: Loginova M.A., PhD, head of Research Laboratory of applied immunogenetics; e-mail: mlogin2010@gmail.com

Information about authors:

Loginova M.A., <http://orcid.org/0000-0001-7088-3986>

Kutyavina S.S., <http://orcid.org/0000-0002-2371-4044>

Smirnova D.N., <https://orcid.org/0000-0002-0090-1891>

Cheranov V.V., <http://orcid.org/0000-0001-5294-3033>

Paramonov I.V., <http://orcid.org/0000-0002-7205-912X>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 29.01.2019
Accepted 01.02.2019

Введение. HLA (Human Leucocyte Antigens) комплекс представляет собой кластер генов с размерами в несколько миллионов пар оснований, расположен-

ных на коротком плече 6-ой хромосомы [1]. При этом наибольшее практическое значение имеют те локусы, генные продукты которых (гетеродимерные белки,

Для корреспонденции: Логинава Мария Александровна, канд. биол. наук, зав.лаб. прикладной иммуногенетики; e-mail: mlogin2010@gmail.com

экспрессируемые на поверхности клеток) имеют решающее значение в формировании иммунного ответа [1-3]. Установлено, что распределение HLA-аллелей и гаплотипов в разных этнических группах имеет выраженные особенности [4]. С момента открытия генов HLA, наиболее важным аспектом клинического применения HLA-типирования является подбор совместимых доноров для пациентов, которые нуждаются в трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [5]. Число потенциальных доноров ГСК, зарегистрированных в объединенной базе данных о российских донорах BMDS (Bone Marrow Donor Search), составляет 89 912 человек [6]. И хотя в неё включены данные о донорах из 15 регистров, которые действуют в 11 регионах Российской Федерации [6], многие популяции, проживающие на территории страны, до сих пор в базе данных не представлены. Мы впервые провели оценку генетических особенностей HLA-аллелей и гаплотипов в когорте потенциальных доноров ГСК, которая проживает на территории Республики Калмыкия.

Материал и методы. В исследование включены 150 образцов цельной крови, которые получены от взрослых индивидов, не имеющих тяжелых хронических заболеваний и жалоб на момент обследования, которые самоопределились как калмыки и проживают на территории Республики Калмыкия. Препараты геномной ДНК получены из замороженных образцов цельной крови (антикоагулянт – K_2EDTA в концентрации 2 мг/мл) методом фильтрации на колонке с помощью диагностических наборов наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия). Концентрацию препаратов ДНК определяли на приборе Qubit® 3.0 Fluorimeter (Thermo Fisher Scientific, США), затем образцы нормализовали деионизированной водой до концентрации 10 нг/мкл. HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 в высоком разрешении (2-fields) проводили с использованием тест-системы VariFind™ HLA Solution IL-v1 (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия). Массовое параллельное секвенирование осуществляли на приборе MiSeq™ System (Illumina Inc., США). Анализ данных провели с помощью пакета программного обеспечения VariFind™ HLA Software (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия).

Для определения частот HLA-аллелей и частот их гаплотипов методом максимального правдоподобия с помощью EM-алгоритма для полилокусных данных использовали программное обеспечение Arlequin v.3.5 [7]. Стандартные отклонения рассчитывали при начальном значении итераций, равном 100. Распределение генов по закону Харди – Вайнберга с количеством шагов в цепи Маркова, равным 100 000, определяли с помощью программного обеспечения Arlequin v.3.5 [7].

Результаты. Частоты встречаемости аллелей HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB1 и HLA-DRB1 с соответствующими стандартными отклонениями представлены в табл. 1 и 2. В результате данного исследования выявлено 29 аллелей по локусу HLA-A, 44 – по локусу HLA-B, 26 – по локусу HLA-C, 15 – по локусу DQB1, 37 – по локусу HLA-DRB1. Наибольшей частотой встречаемости среди аллелей локуса HLA-A обладает HLA-A*24:02 (22,7%), а затем в порядке убывания частоты встречаемости располагаются HLA-A*02:01 (11,7%), HLA-A*01:01 (11%), HLA-A*11:01 (8%), HLA-A*33:03 (6,3%), HLA-A*26:01 (5%), HLA-A*02:05 (4,3%), HLA-

A*31:01 (4,3%), HLA-A*02:06 (4%), HLA-A*02:07 (4%), HLA-A*03:01 (4%), HLA-A*68:01 (2,7%), HLA-A*32:01 (2,3%), HLA-A*23:01 (1,7%), HLA-A*25:01 (1,7%), HLA-A*30:01 (1,3%). 11 из 29 аллелей выявлено в единичном случае.

В локусе HLA-B частоту встречаемости больше 10% имеют 29 из 44 аллелей. Наибольший показатель этого параметра, равный 10,3%, имеют аллели B*51:01 и B*58:01. Так же к десяти часто встречающимся вариантам относятся аллели HLA-B*40:02 (6,7%), HLA-B*35:01 (6%), HLA-B*50:01 (5%), HLA-B*37:01 (4,7%), HLA-B*48:01 (4,3%), HLA-B*13:02 (4%), HLA-B*15:01 (3,7%), HLA-B*57:01 (3,7%). 6 из 10 аллелей, выявленных по одному разу, относятся к аллельной группе HLA-B*15. В локусе HLA-C можно выделить три аллеля, частота встречаемости которых превышает 10% – HLA-C*06:02 (17,7%), HLA-C*03:04 (10,3%), HLA-C*03:02 (10%). На долю этих аллелей приходится 38% от всех определенных аллелей локуса HLA-C. Для локуса HLA-DQB1 выявлено 15 аллелей. Наиболее часто встречается аллель DQB1*03:01 (26,7%), определенный в 66 образцах из 150 исследованных. Наименее распространенным является аллель DQB1*06:04 (0,7%), обнаруженный лишь у 2 человек.

Среди 37 полученных аллелей локуса HLA-DRB1 частоту встречаемости более 10% имеет только аллель DRB1*07:01 (11,7%). Далее в порядке убывания частоты располагаются аллели, частота встречаемости которых более 5%, DRB1*03:01, DRB1*09:01, DRB1*11:01, DRB1*01:01, DRB1*15:01, DRB1*13:01, DRB1*13:02. Гаплотипы HLA-A-B-C-DQB1-DRB1 с частотой встречаемости более 1% представлены в табл. 3. В общей сложности определено 223 из 3762 потенциально возможных гаплотипов. По результатам анализа максимальную частоту встречаемости в исследованной популяции имеют гаплотипы A*02:05-B*50:01-C*06:02-DQB1*02:02-DRB1*07:01 (3,7%), A*33:03-B*58:01-C*03:02-DQB1*06:09-DRB1*13:02 (2,3%), A*33:03-B*58:01-C*03:02-DQB1*02:01-DRB1*03:01 (2%), A*26:01-B*51:01-C*15:02-DQB1*03:01-DRB1*14:12 (1,7%). Результаты анализа каждого локуса на соответствие равновесному распределению Харди – Вайнберга представлены в табл. 4. Для всех локусов значение $p > 0,05$, что свидетельствует о соответствии распределения генотипов закону Харди – Вайнберга.

При проведении HLA-типирования для четырех образцов не найдено полного совпадения аллельного профиля по одному из локусов в базе данных HLA-аллелей IMGT/HLA 3.30.0 [8]. Характеристика потенциальных новых аллелей представлена в табл. 5. Из табл. 5 следует, что нуклеотидная замена во всех аллелях произошла за пределами пептид-связывающего сайта. Потенциально новые аллели в образцах RMC56683 и RMC56866 подтверждены методом SBT (Sequence Based Typing) с использованием наборов реагентов HLAssure SE SBT Kit (TBG Diagnostics Limited, Тайвань), и их последовательности поданы на регистрацию в Комитет по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ. 31.12.2018 г. и 31.01.2019 г. указанным аллелям были присвоены номера HLA-DRB1*07:100 и HLA-A*02:06:23. Два других новых аллеля требуют подтверждения методом, позволяющим секвенировать четвертый экзон для локусов HLA-DRB1 и HLA-DQB1.

Обсуждение. В ходе проведенных исследований получены данные о частотах встречаемости HLA- аллелей

и гаплотипов в популяции калмыков, проживающей на территории Республики Калмыкия. Популяция калмыков этнически относится к монгольскому народу ойратской группы и проживает в Республике Калмыкия, входящей в состав Южного Федерального округа Российской Федерации, граничащей с Республикой Дагестан, Ставропольским краем, Ростовской, Волгоградской и Астраханской областями [9, 10]. Территориальное расположение республики и этническая принадлежность определили группы сравнения для выявления генетических особенностей исследуемой популяции. Следует отметить, что для большинства ранее изученных популяций монгольских народов в базе данных The Allele Frequency Net Database [4] есть результаты типирования лишь по отдельным локусам, и чаще всего в низком разрешении.

Полученный профиль частоты распределения аллелей локуса HLA-A: HLA-A*24:02 (22,7%), HLA-A*02:01 (11,7%), HLA-A*01:01 (11%) – совпадает с профилем распределения аллелей у монгольских бурятов - HLA-A*24:02 (20%), HLA-A*02:01 (14,3%), HLA-A*01:01 (11,4%) [4] и бурятов, проживающих на территории Иркутской области - HLA-A*24:02 (22,1%), HLA-A*02:01 (13,6%), HLA-A*01:01 (10,9%) [11]. Подобное распределение аллелей локуса HLA-A имеют популяции монголов, проживающих на территории Китая (HLA-A*24:02 (19,6%), HLA-A*11:01 (16,2%), HLA-A*02:01 (12,7%)), острова Беринга (HLA-A*24:02 (24,1%), HLA-A*02:01 (22,4%), HLA-A*03:01 (12,9%)) и популяции тувинцев (HLA-A*24:02 (21,5%), HLA-A*02:01 (14,3%), HLA-A*31:01 (9,8%)) [4].

В ходе оценки локуса HLA-A выявлено два аллеля - A*01:109 и A*24:130, информация о частоте встречаемости которых отсутствует в базе данных The Allele Frequency Net Database [4]. Два наиболее распространенных аллеля локуса HLA-B в популяции калмыков: HLA-B*58:01 и HLA-B*51:01 (10,3%) – также выявлены в популяции монголов, проживающих в Китае, на первом (8,8%), и третьем (5,9%) местах по частоте встречаемости соответственно. Второй по частоте встречаемости в исследуемой популяции аллель HLA-B*40:02 (6,7%) располагается на этом же месте у монголов Китая (6,9%) [4]. Что позволяет сделать вывод о том, что профили распределения аллелей HLA-B в этих популяциях очень близки.

Аллели HLA-B*58:01, HLA-B*51:01 и HLA-B*40:02 также выявлены в российских популяциях, проживающих в республиках Тыва (HLA-B*58:01 – 6,7%, HLA-B*40:02 – 9,7%), Карелия (HLA-B*51:01 – 4,5%, HLA-B*58:01 – 0,9%, HLA-B*40:02 – 2,9%) и на острове Беринга (HLA-B*40:02 – 15,3%, HLA-B*51:01 – 2,9%, HLA-B*58:01 – 0,1%) [4]. Следует отметить, что аллели группы HLA-B*58 являются наиболее часто встречающимися в популяции цаатанов – тюркоязычной группы монголов [4, 12]. Выявленный в данном исследовании в единичном случае аллель HLA-B*51:02 ранее не был заявлен ни в российских, ни в монгольских популяциях. Среди аллелей локуса HLA-C наиболее часто встречающимися являются HLA-C*06:02 (17,7%), HLA-C*03:04 (10,3%), HLA-C*03:02 (10%). Самый распространенный аллель HLA-C*06:02 занимает первое место по частоте выявления в популяции тувинцев (11,5%), второе – в популяции архангельских поморов (16,9%), третье – в северо-осетинской популяции (15,3%) [4]. Максимально близкими профилями распределения частот встречае-

мости аллелей локуса HLA-C обладают популяции монголов Китая (HLA-C*07:02 – 12,7%, C*06:02 – 11,8%, HLA-C*03:03 – 9,8%) и нивхи, являющиеся коренной этнической группой острова Сахалин (HLA-C*03:04 – 32,1%, HLA-C*06:02 – 8,5%, HLA-C*03:03 – 13,2%) [4]. В большинстве монгольских популяций самыми распространенными также являются аллельные группы C*03 и C*06 (оолд-монголы – 30,8% и 10,6%, цаатаны – 39,6% и 16,7%) [4].

Наиболее высоким значением частоты встречаемости в изученной популяции обладает аллель HLA-DQB1*03:01 (26,7%); он распространен во многих северных популяциях в России. Так, например, в популяции эскимосов Чукотского полуострова на его долю приходится 67%, в популяции сибирских эвенков – 66% [4], в популяции бурятов из Иркутска – 29,9% [11]. Профиль распределения трех самых частых аллелей в популяции калмыков: HLA-DQB1*03:01 (26,7%), HLA-DQB1*02:02 (10%), HLA-DQB1*03:03 (9,7%) – совпадает с профилем распределения оолд-монголов (44,2%, 8,7%, 7,7% соответственно) и близок профилям распределения халха-монголов (HLA-DQB1*03:01 (25,5%), HLA-DQB1*03:03 (13,5%), HLA-DQB1*02:01 (11,5%)) [4], бурятов из Иркутска (HLA-DQB1*03:01 (29,9%), HLA-DQB1*02:02 (11,3%), HLA-DQB1*06:02 (8,2%)) [11]. По результатам проведенного исследования в локусе HLA-DRB1 определен следующий профиль распределения частот встречаемости аллелей: HLA-DRB1*07:01 (11,7%), HLA-DRB1*03:01 (8,7%), HLA-DRB1*09:01 (7,3%), близкий к профилям халха-монголов (HLA-DRB1*07:01 (12%), HLA-DRB1*03:01 (9%), HLA-DRB1*01:01 (6,5%)) и цаатан-монголов (HLA-DRB1*03:01 (12,5%), HLA-DRB1*07:01 (11,8%), HLA-DRB1*04:01 (10,4%)) [4].

Наиболее распространенный аллель в популяции калмыков DRB1*07:01 (11,7%) является также самым часто встречающимся в популяции бурятов Иркутской области (13,6%), нижеудинских бурятов Сибири (26%), ханты-мансийской популяции (17,6%) и популяции, проживающей на острове Беринга (16,5%) [4, 11]. В трех последних приведенных российских популяциях на втором месте по частоте встречаемости расположен аллель DRB1*15:01 (18%, 10,3%, 11,8% соответственно), который в популяции Республики Калмыкия выявлен в 5,3% [4].

В настоящее время для большинства монгольских и российских популяций отсутствует информация о пяти-локусных гаплотипах, а также о гаплотипах в высоком разрешении. В ходе выполнения исследования определено 223 из 3762 потенциально возможных гаплотипов. Максимальную частоту встречаемости, равную 3,7%, имеет вариант A*02:05-B*50:01-C*06:02-DQB1*02:02-DRB1*07:01. Поиск идентичного гаплотипа в высоком разрешении в базе The Allele Frequency Net Database результатов не дал. Данный гаплотип в низком разрешении A*02-B*50-C*06-DQB1*02-DRB1*07 выявлен в северо-осетинской популяции (1,2%) и в двух популяциях, проживающих на территории Республики Карелия (1,1% и 0,6%) [13]. Второй по частоте встречаемости гаплотип калмыков A*33:03-B*58:01-C*03:02-DQB1*06:09-DRB1*13:02 (2,3%) выявлен в популяции бурят Иркутской области, где он занимает пятое место (1,9%), также он определен в популяциях жителей Северной Кореи (3%), некоторых азиатских (1,4%) и северокорейских (2,7%) популяциях, проживающих на территории США [13].

Проведенное исследование выявило сходство про-

HLA-аллели локусов I класса и частоты их встречаемости

HLA-A			HLA-B			HLA-C		
аллель	частота встречаемости	стандартное отклонение	аллель	частота встречаемости	стандартное отклонение	аллель	частота встречаемости	стандартное отклонение
A*01:01	0,110000	0,018624	B*07:02	0,030000	0,010391	C*01:02	0,063333	0,013990
A*01:109	0,003333	0,003013	B*07:05	0,003333	0,003159	C*01:03	0,010000	0,005880
A*02:01	0,116667	0,017079	B*08:01	0,013333	0,006419	C*02:02	0,030000	0,010147
A*02:05	0,043333	0,011205	B*13:01	0,010000	0,005848	C*03:02	0,100000	0,019013
A*02:06	0,040000	0,012029	B*13:02	0,040000	0,010721	C*03:03	0,043333	0,011355
A*02:07	0,040000	0,011152	B*14:02	0,006667	0,004639	C*03:04	0,103333	0,017406
A*03:01	0,040000	0,011676	B*15:01	0,036667	0,011374	C*04:01	0,063333	0,012843
A*03:02	0,003333	0,003282	B*15:02	0,003333	0,003990	C*05:01	0,013333	0,006280
A*11:01	0,080000	0,014244	B*15:03	0,003333	0,002896	C*06:02	0,176667	0,025626
A*11:02	0,003333	0,003363	B*15:08	0,003333	0,003314	C*07:01	0,030000	0,009806
A*23:01	0,016667	0,007200	B*15:12	0,003333	0,003373	C*07:02	0,073333	0,014839
A*24:02	0,226667	0,021016	B*15:17	0,003333	0,003159	C*07:04	0,020000	0,008439
A*24:49	0,003333	0,002973	B*15:18	0,013333	0,007331	C*07:18	0,003333	0,003665
A*24:130	0,003333	0,003383	B*15:27	0,003333	0,003332	C*08:01	0,043333	0,012776
A*25:01	0,016667	0,007906	B*18:01	0,023333	0,008319	C*08:02	0,006667	0,004642
A*26:01	0,050000	0,014097	B*27:02	0,006667	0,004329	C*08:03	0,023333	0,008350
A*29:01	0,006667	0,005220	B*27:04	0,010000	0,005523	C*12:02	0,023333	0,007939
A*29:02	0,003333	0,003131	B*27:05	0,023333	0,009092	C*12:03	0,053333	0,012058
A*30:01	0,013333	0,006129	B*35:01	0,060000	0,014334	C*14:02	0,046667	0,011855
A*30:02	0,003333	0,003416	B*35:03	0,020000	0,008398	C*14:03	0,003333	0,003592
A*30:04	0,003333	0,003420	B*37:01	0,046667	0,011559	C*15:02	0,053333	0,014520
A*31:01	0,043333	0,012199	B*38:01	0,026667	0,008205	C*15:04	0,003333	0,003196
A*32:01	0,023333	0,008019	B*38:02	0,006667	0,004842	C*15:05	0,003333	0,003226
A*33:01	0,003333	0,003586	B*39:01	0,013333	0,007220	C*16:01	0,003333	0,003130
A*33:03	0,063333	0,013869	B*40:01	0,026667	0,010288	C*16:02	0,003333	0,003107
A*66:01	0,003333	0,002807	B*40:02	0,066667	0,014121	C*17:01	0,003333	0,003347
A*68:01	0,026667	0,009765	B*40:06	0,010000	0,005665			
A*68:02	0,006667	0,004375	B*41:01	0,003333	0,003217			
A*74:01	0,003333	0,003540	B*44:02	0,023333	0,009966			
			B*44:03	0,006667	0,004651			
			B*45:01	0,003333	0,003191			
			B*46:01	0,030000	0,009498			
			B*48:01	0,043333	0,012922			
			B*49:01	0,010000	0,005623			
			B*50:01	0,050000	0,011116			
			B*51:01	0,103333	0,017414			
			B*51:02	0,003333	0,003768			
			B*52:01	0,023333	0,007943			
			B*53:01	0,006667	0,004699			
			B*54:01	0,013333	0,006759			
			B*55:01	0,013333	0,006473			
			B*55:02	0,013333	0,006336			
			B*57:01	0,036667	0,011516			
			B*58:01	0,103333	0,016569			

HLA-аллели локусов II класса и частоты их встречаемости

HLA-DQB1			HLA-DRB1		
аллель	частота встречаемости	стандартное отклонение	аллель	частота встречаемости	стандартное отклонение
DQB1*02:01	0,086667	0,014429	DRB1*01:01	0,053333	0,014924
DQB1*02:02	0,100000	0,016399	DRB1*01:02	0,003333	0,002948
DQB1*03:01	0,266667	0,025412	DRB1*03:01	0,086667	0,015115
DQB1*03:02	0,053333	0,013860	DRB1*04:01	0,046667	0,012127
DQB1*03:03	0,096667	0,016244	DRB1*04:02	0,006667	0,005423
DQB1*04:01	0,016667	0,007504	DRB1*04:03	0,010000	0,005460
DQB1*04:02	0,020000	0,007015	DRB1*04:04	0,016667	0,007284
DQB1*05:01	0,096667	0,018143	DRB1*04:05	0,010000	0,005295
DQB1*05:02	0,053333	0,013224	DRB1*04:06	0,010000	0,005361
DQB1*05:03	0,013333	0,006080	DRB1*04:07	0,010000	0,005808
DQB1*06:01	0,046667	0,012106	DRB1*04:10	0,006667	0,004593
DQB1*06:02	0,046667	0,011623	DRB1*07:01	0,116667	0,017737
DQB1*06:03	0,050000	0,012446	DRB1*07:100	0,003333	0,003229
DQB1*06:04	0,006667	0,004457	DRB1*08:01	0,003333	0,003339
DQB1*06:09	0,046667	0,010962	DRB1*08:02	0,006667	0,004020
			DRB1*08:03	0,030000	0,010690
			DRB1*08:04	0,003333	0,003052
			DRB1*09:01	0,073333	0,015724
			DRB1*10:01	0,040000	0,010357
			DRB1*11:01	0,066667	0,014200
			DRB1*11:03	0,006667	0,004381
			DRB1*11:04	0,010000	0,006080
			DRB1*11:06	0,003333	0,003182
			DRB1*12:01	0,043333	0,011465
			DRB1*12:02	0,026667	0,010177
			DRB1*13:01	0,050000	0,012368
			DRB1*13:02	0,050000	0,011696
			DRB1*13:03	0,006667	0,005045
			DRB1*13:29	0,003333	0,003299
			DRB1*14:03	0,023333	0,007892
			DRB1*14:07	0,003333	0,003503
			DRB1*14:12	0,040000	0,011942
			DRB1*14:54	0,040000	0,011779
			DRB1*15:01	0,053333	0,014498
			DRB1*15:02	0,020000	0,008393
			DRB1*16:01	0,010000	0,006009
			DRB1*16:02	0,006667	0,004368

Таблица 3

Гаплотипы HLA-A-B-C-DQB1-DRB1 в порядке уменьшения частоты встречаемости

Гаплотипы HLA-A-B-C-DRB1-DQB1	Частота встречаемости	Стандартное отклонение
A*02:05-B*50:01-C*06:02-DQB1*02:02-DRB1*07:01	0,036667	0,011200
A*33:03-B*58:01-C*03:02-DQB1*06:09-DRB1*13:02	0,023333	0,012850
A*33:03-B*58:01-C*03:02-DQB1*02:01-DRB1*03:01	0,020000	0,006143
A*26:01-B*51:01-C*15:02-DQB1*03:01-DRB1*14:12	0,016667	0,005973
A*11:01-B*35:01-C*04:01-DQB1*05:01-DRB1*01:01	0,013333	0,007666
A*24:02-B*37:01-C*06:02-DQB1*05:01-DRB1*10:01	0,013333	0,009169
A*24:02-B*40:02-C*03:04-DQB1*03:01-DRB1*12:01	0,013333	0,008248
A*24:02-B*48:01-C*08:03-DQB1*03:03-DRB1*09:01	0,013333	0,006992
A*30:01-B*13:02-C*06:02-DQB1*02:02-DRB1*07:01	0,013333	0,005709
A*01:01-B*37:01-C*06:02-DQB1*05:01-DRB1*01:01	0,013333	0,005890
A*01:01-B*57:01-C*06:02-DQB1*03:03-DRB1*07:01	0,013333	0,007062
A*01:01-B*58:01-C*03:02-DQB1*02:01-DRB1*03:01	0,013333	0,006998
A*24:02-B*40:02-C*03:04-DQB1*03:01-DRB1*11:01	0,010000	0,005270
A*24:02-B*51:01-C*15:02-DQB1*03:01-DRB1*14:12	0,010000	0,005676
A*68:01-B*35:01-C*03:03-DQB1*06:02-DRB1*15:01	0,010000	0,009088
A*02:07-B*46:01-C*01:02-DQB1*06:01-DRB1*08:03	0,010000	0,005317
A*01:01-B*58:01-C*03:02-DQB1*06:09-DRB1*13:02	0,010000	0,005545

Таблица 4

Уровни соответствия закону Харди – Вайнберга и ожидаемая гетерозиготность изученных локусов

Локус	Количество образцов	Гетерозиготность		Достижимый уровень значимости (P-value)	Стандартное отклонение
		обнаруженная экспериментально	ожидаемая		
HLA-A	150	0,91333	0,73984	0,73984	0,00018
HLA-B	150	0,94667	0,51712	0,51712	0,00014
HLA-C	150	0,92000	0,92046	0,92046	0,00013
HLA-DQB1	150	0,83333	0,58121	0,58121	0,00030
HLA-DRB1	150	0,94000	0,95237	0,95237	0,00008

Таблица 5

Характеристика новых аллелей

№ образца	HLA-локус	Участок локализации нуклеотидной замены	Описание замены	Тип замены	Метод идентификации	Метод подтверждения
RMC56682	HLA-DQB1	четвертый	HLA-DQB1*03:новый отличается от HLA-DQB1*03:02:01:01 в позиции 714, где вместо С стоит Т, кодон 206 меняется с TTC на TTT	синонимичная	NGS (VariFind™ HLA Solution IL-v1)	-
RMC56683	HLA-DRB1	третий	HLA-DRB1*07:новый отличается от HLA-DRB1*07:01:01:01 в позиции 509, где вместо G стоит А, кодон 141 меняется с GGG на GAG	кодирующая	NGS (VariFind™ HLA Solution IL-v1)	SBT (HLAssure SE SBT Kit)
RMC56866	HLA-A	пятый	HLA-A*02:новый отличается от HLA-A*02:06:01:01 в позиции 900, где вместо G стоит А, кодон 276 меняется с CCG на CCA	синонимичная	NGS (VariFind™ HLA Solution IL-v1)	SBT (HLAssure SE SBT Kit)
RMC56884	HLA-DRB1	четвертый	HLA-DRB1*12:новый отличается от HLA-DRB1*12:01:01:01 в позиции 732, где вместо С стоит Т, кодон 215 меняется с GCC на GCT	синонимичная	NGS (VariFind™ HLA Solution IL-v1)	-

филя HLA-аллелей калмыков с профилями некоторых популяций монгольских народов, которые практически не представлены в российском регистре. Идентифицированные новые аллели и ряд генетических отличий популяции калмыков от российских популяций подчеркивают актуальность дальнейшего изучения населения, проживающего на территории Российской Федерации. Это позволит наполнять национальный регистр генетически охарактеризованных потенциальных доноров ГСК с учетом популяционных особенностей, тем самым увеличивая шанс подбора совместимых доноров для пациентов, нуждающихся в трансплантации ГСК.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (1–5, 7, 8, 13 см. REFERENCES)

6. Счетчик регистра (2018). Доступен: http://www.rdkm.rusfond.ru/registr_stat/001 (обновление 30.11.2018).
9. Калмыки. Доступен: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Калмыки>.
10. Калмыкия. Доступен: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Калмыкия>.
11. Кутявина С.С., Логинова М.А., Черанев В.В., Парамонов И.В., Зарубин М.В., Верёвкина Л.Н. Генетические особенности HLA-аллелей у Бурят, проживающих на территории Иркутской области. *Гематология и трансфузиология*. 2017; 3(62): 147-52.
12. Цаатаны. Доступен: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Цаатаны>.

REFERENCES

1. Horton R., Wilming L., Rand V. et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat. Rev. Genet.* 2004; 5(12): 889-99.

2. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.
3. Consortium T.Ms. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature*. 1999; 401(6756): 921-3.
4. The Allele Frequency Net Database. HLA Allele Freq. Classical. Available at: <http://www.allelefrequencies.net/hla6006a.asp>.
5. Wingard J.R., Gastineau D.A., Leather H.L. et al. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. A Handbook for Clinicians. 2nd Edition. AABB. Bethesda. Maryland. 2015; 970.
6. The counter register (2018). Available at: http://www.rdkm.rusfond.ru/registr_stat/001 (update 30.11.2018). (in Russian)
7. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2007; 23(1): 47-50.
8. IPD-IMGT/HLA Database. European Bioinformatics Institute. Available at: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>.
9. Kalmyks. Available at: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Калмыки> (in Russian)
10. Kalmykia. Available at: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Калмыкия> (in Russian)
11. Kutyavina S.S., Loginova M.A., Cheranov V.V., Paramonov I.V., Zarubin M.V., Verevkin L.N. Genetic features of HLA alleles in Buryat living in the territory of the Irkutsk region. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2017; 62 (3): 147-52. (in Russian)
12. Tsaatans. Available: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Цаатана> (in Russian)
13. The Allele Frequency Net Database. HLA Haplotype Frequency Search. Available at: <http://www.allelefrequencies.net/hla6003a.asp>.

Поступила 29.01.19

Принята к печати 01.02.19

МИКРОБИОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Булгакова С. В., Тренева Е. В., Захарова Н. О., Труханова И. Г.

КИШЕЧНАЯ МИКРОБИОТА: СВЯЗЬ С ВОЗРАСТ-АССОЦИИРОВАННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

Рост продолжительности жизни определяет увеличение в популяции числа лиц старших возрастных групп и, вместе с этим, возраст ассоциированных заболеваний, имеющих большую медико-социальную значимость. К таким заболеваниям относятся болезнь Альцгеймера (БА), остеопороз, саркопения, атеросклероз и другие сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ). В литературе широко обсуждается роль кишечной микробиоты в патогенезе этих нозологий. В ряде исследований показана эффективность применения пробиотиков и пребиотиков при лечении данных заболеваний. Обобщено современное понимание роли кишечной микробиоты в развитии, профилактике, лечении основных возраст ассоциированных заболеваний.

Ключевые слова: кишечная микробиота; болезнь Альцгеймера; саркопения; остеопороз; атеросклероз; сердечно-сосудистая патология.

Для цитирования: Булгакова С. В., Тренева Е. В., Захарова Н. О., Труханова И. Г. Кишечная микробиота: связь с возраст-ассоциированными заболеваниями (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64 (4): 250-256. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-250-256>

Bulgakova S. V., Treneva E. V., Zakharova N. O., Trukhanova I. G.

INTESTINAL MICROBIOTA: RELATIONSHIP TO AGE-ASSOCIATED DISEASES (REVIEW OF LITERATURE)

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

In connection with the increase in life expectancy, the number of people of older age groups is increasing, and with it the age of associated diseases, which are of tremendous medical and social importance. Such diseases include Alzheimer's disease, osteoporosis, sarcopenia, atherosclerosis and other cardiovascular pathology. The role of the gut microbiota in the pathogenesis of these nosologies is widely discussed in the literature. In addition, a number of studies have shown the effectiveness of the use of probiotics and prebiotics in the treatment of these diseases. The review of the literature summarizes the current understanding of the role of the intestinal microbiota in the development, prevention, and treatment of major age-related diseases.

Key words: gut microbiota; Alzheimer's disease; sarcopenia; osteoporosis; atherosclerosis; cardiovascular pathology.

For citation: Bulgakova S.V., Treneva E.V., Zakharova N.O., Trukhanova I.G. Intestinal microbiota: relationship to age-associated diseases (review of literature) *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (4): 250-256 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-250-256>

For correspondence: Treneva E.V., Ph.D. (Medicine), assistant of the chair of geriatrics and age-related endocrinology; e-mail: eka1006@yandex.ru

Information about authors:

Bulgakova S.V., <http://orcid.org/0000-0003-0027-1786>

Treneva E.V., <http://orcid.org/0000-0003-0097-7252>

Zakharova N.O., <http://orcid.org/0000-0001-7501-830X>

Trukhanova I.G. <http://orcid.org/0000-0002-2191-1087>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 05.03.2019
Accepted 28.03.2019

Наибольшее количество микрофлоры организма человека приходится на желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), включая ротоглотку – 75-78%. Кишечник населён более чем 10^{14} микроорганизмами (кишечная микробиота). Это более 50 родов и 500 видов бактерий, количество которых в ЖКТ человека превышает на один

порядок число клеток человеческого организма. Большинство микроорганизмов колонизирует подвздошную и толстую кишку. Численность микробиоты постепенно увеличивается по ходу кишечника, составляя в тонкой кишке 10^2 - 10^7 КОЕ/г и достигая максимума в толстом кишечнике – до 10^{11} КОЕ/г, что обусловлено различием pH и действием ферментов в различных отделах кишечника [1].

Состав кишечной микробиоты формируется в течение одного-трёх лет после рождения, может изменяться

Для корреспонденции: Тренева Екатерина Вячеславовна, канд. мед. наук, ассистент каф. гериатрии и возрастной эндокринологии; e-mail: eka1006@yandex.ru

в результате приёма пищи, стресса, лечения антибиотиками, старения [2; 3; 4]. Основные представители микробиоты у взрослого человека – Firmicutes, Bacteroidetes, далее по распространённости следует Proteobacteria, Actinobacteria, Faecalibacteria [5]. С возрастом видовое разнообразие микробиоты снижается: у пожилых доминируют *Bacteroidetes* в отличие от молодых у которых преобладают *Firmicutes*, количественно снижаются *Bifidobacteria*, увеличиваются *Enterobacteria (Escherichia coli)*, уменьшается количество бактерий с противовоспалительными свойствами, таких как *Faecalibacterium prauznitzii* [6].

Функции кишечной микробиоты разнообразны [1, 4]:

1. Обеспечение колонизационной резистентности: подавление транслокации микроорганизмов из просвета кишечника в системный кровоток. Межмикробный антагонизм: продукция органических кислот, перекиси водорода, мурамидазы, антибиотикоподобных веществ;

2. Пищеварительная: расщепление пищевых волокон, синтез короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), участие в обмене желчных кислот, синтезе и усилении активности пищеварительных ферментов, контроль массы тела;

3. Иммуномодулирующая: участвуют в синтезе IgA, интерферонов, про- и противовоспалительных цитокинов, лизоцима и др.

4. Синтетическая функция: синтез витаминов (группы К, группы В), аминокислот, биоактивных аминов и других биологически активных веществ;

5. Дезинтоксикационная, антимуtagenная, антиканцерогенная функция: гидролиз продуктов метаболизма белков, липидов, углеводов, инактивация гистамина, ксенобиотиков, проканцерогенов, деконъюгация желчных и гидроксильное окисление жирных кислот;

6. Регуляторная функция: регуляция иммунной, эндокринной, нервной систем (последней – через так называемую «кишечно-мозговую ось» - «gut-brain axis»).

Кишечная микробиота – экстракорпоральный орган, играющий важнейшую роль в обеспечении здоровья человека и в развитии заболеваний. Дисбиоз кишечника связан с такими заболеваниями, как ожирение, сахарный диабет 2 типа, неалкогольная жировая болезнь печени, аутизм, воспалительные заболевания кишечника, злокачественные новообразования (колоректальный рак, рак молочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома), большая часть которых носит явный возраст-ассоциированный характер [7-12].

Население мира быстро стареет. За период с 2000 по 2050 гг. доля населения мира в возрасте старше 60 лет удвоится примерно с 11% до 22%. Ожидается, что абсолютное число людей в возрасте 60 лет и старше возрастет за этот же период с 605 млн до 2 млрд человек. Во всем мире происходит рост ожидаемой продолжительности жизни. К 2020 г. впервые в истории численность людей в возрасте 60 лет и старше превысит численность детей младше 5 лет [13]. Вместе с этим происходит и рост заболеваний, ассоциированных с возрастом, таких как болезнь Альцгеймера, остеопороз, саркопения, атеросклероз и сердечно-сосудистая патология, являющихся основными причинами снижения активности повседневной жизни и инвалидности во всем мире, несущих огромные медико-социальные затраты. [11, 14, 15]. Остро стоит вопрос поиска методов профилактики и лечения таких заболеваний.

Кишечная микрофлора взаимодействует с нервной [12, 16, 17], костно-мышечной [18-21], сердечно-сосудистой [14, 22, 23] системами. Высказано предположение, что воздействие на кишечную микробиоту может быть ключевой стратегией для профилактики и/или лечения вышеуказанных возраст-ассоциированных заболеваний. Доказаны три возможных механизма посредством которых кишечная микробиота может воздействовать на органы и системы. Во-первых, поглощение питательных веществ из пищи или продукция микробных метаболитов, таких как короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) или витамины; во-вторых, регулирование системного иммунного ответа; в-третьих, обеспечение колонизационной резистентности [24]. Мы постарались систематизировать современные представления о роли кишечной микробиоты в развитии БА, остеопороза, саркопении, атеросклероза и ССЗ.

Болезнь Альцгеймера - нейродегенеративное заболевание и основная причина снижения когнитивных функций у пожилых людей. Патологическим субстратом БА является отложение бета-амилоида (Аβ) в головном мозге. Нейровоспалительные реакции, вызванные совместным влиянием отложений Аβ, липополисахаридов (ЛПС), воздействия бактериальных продуктов или нейроактивных молекул, могут быть более важны для развития БА, чем отложения самого Аβ [25]. Идентифицирована ось микробиота-кишечник-головной мозг. Эта ось позволяет кишечной микробиоте влиять на физиологию и патологию головного мозга. Барьеры слизистой оболочки кишечника иногда разрушаются патогенными бактериями и их продуктами, такими как ЛПС, что ведёт к увеличению проницаемости кишечного эпителия и транслокации в кровоток и через гематоэнцефалический барьер в головной мозг токсических продуктов. Бактерии и/или их продукты из кишечника могут вызывать хронические воспалительные реакции в головном мозге, причём эти реакции, в свою очередь, ведут к развитию нейродегенеративных поражений головного мозга, характерных для БА [26]. Сигнальные пути через ось кишечник-мозг могут участвовать в патогенезе БА [27,28]. Иммунная система может быть важным регулятором кишечно-мозговых взаимодействий. Кишечные микроорганизмы влияют на созревание и функцию микроглии, наиболее распространённого типа иммунокомпетентных клеток, находящихся в мозге [29]. Микробиота кишечника модулирует активность астроцитов, которые способны распознавать антиген и вырабатывать цитокины. Микроорганизмы модулируют активацию и созревание периферических иммунокомпетентных клеток. Все эти действия кишечной микробиоты могут быть связаны с нейровоспалением, повреждением головного мозга, аутоиммунитетом [30]. Головной мозг может регулировать работу кишечника с помощью неврологических, иммунных, гормональных взаимодействий [11].

Мыши без кишечной микробиоты (GF) предоставляют важную информацию о роли микробиоты кишечника в гомеостазе и функции головного мозга. Мыши GF характеризуются поведением, подобным тревожному, что может быть связано с повышенной экспрессией белка постсинаптической плотности 95 [31]. У мышей GF обнаружен дефицит пространственной или рабочей памяти [32]. Эти данные позволяют предположить, что кишечная микробиота играет ключевую роль в нормальном функционировании головного мозга.

Кишечная микробиота играет и отрицательную роль

[33]. Эксперименты на мышинной модели БА обнаружили, что отложение $A\beta$ в головном мозге у трансгенных мышей GF-APPSP1 ниже, чем у традиционно выращенных трансгенных мышей APPSP1. Колонизация мышей GF-APPSP1 микробиотой показала повышенные уровни депонирования $A\beta$ в головном мозге, что указывает на то, что кишечная микробиота участвует в отложениях $A\beta$ в головном мозге [33]. Эти данные позволяют предположить, что состав и/или баланс кишечной микрофлоры может оказывать определённое влияние на физиологию и патологию мозга.

Микробиота кишечника продуцирует ряд веществ, в том числе КЦЖК, серотонин, ЛПС, которые действуют как медиаторы не только физиологических функций, но и патологических реакций. Основными КЦЖК являются бутират, ацетат, пропионат, причём каждая молекула имеет специфические функции в кишечнике и/или головном мозге. Бутират обладает защитными свойствами в головном мозге [34]. Введение бутирата натрия на модели БА мышей улучшило обучение и функцию памяти [35]. Из фекалий пациентов с БА выделены четыре новых вида культивируемых бактерий, продуцирующих бутират; изучение механизма синтеза бутирата этими бактериями может дать новый подход к стимулированию производства бутирата в кишечнике, что, возможно, приведёт к улучшению функции памяти у пациентов с БА [36].

Кишечная микробиота вырабатывает более 90% всего серотонина организма человека, важного метаболита, регулирующего когнитивные способности, экзогенный серотонин оказался эффективным в снижении отложения $A\beta$ в головном мозге [26]. У мышей GF наблюдается снижение уровня серотонина в сыворотке, что подтверждает тот факт, что кишечная микробиота является основным источником серотонина. До настоящего времени отсутствуют доказательства того, что в физиологических условиях серотонин, вырабатываемый в кишечнике, преодолевает гематоэнцефалический барьер. Фактическая роль серотонина, вырабатываемого в кишечнике, в функции головного мозга остается неясной. Такие метаболиты кишечной микробиоты, как маннит, янтарная кислота, 3,4-дигидроксибензолуксусная кислота могут быть связаны с ухудшением когнитивных функций или предрасположенностью к БА [25].

Отсутствуют доказательства того, что какой-то определённый микроорганизм связан с развитием БА. Показано, что уменьшение разнообразия микроорганизмов в микробиоте связано с БА [26]. Аналогичная отрицательная корреляция между разнообразием кишечной микробиоты и восприимчивостью к развитию БА наблюдалась при сравнительном анализе кишечных микроорганизмов у людей из развитых и развивающихся стран. Микробное разнообразие ниже, а распространённость БА выше в развитых странах, чем в развивающихся [37].

Вклад кишечной микробиоты в когнитивную функцию косвенно подтверждается влиянием пробиотических микроорганизмов на БА. Пробиотические микроорганизмы поддерживают или восстанавливают нормальную микрофлору кишечника. Обнаружено, что прием пробиотиков, содержащих *Lactobacillus helveticus* R0052 и *Bifidobacterium longum* R0175, облегчает когнитивно-поведенческие реакции на внешние раздражители у здоровых добровольцев [5]. Введение штамма A1 *Bifidobacterium breve* мышам с БА-моделями устраняет когнитивную дисфункцию [38]. Эти данные указывают на

то, что изменения в микробиоте кишечника могут в достаточной степени улучшить когнитивную функцию, и предполагают, что пробиотики могут обладать возможным терапевтическим потенциалом у пациентов с БА.

Остеопороз - системное заболевание, характеризующееся снижением плотности и нарушением качества костной ткани, является основной причиной низкотравматичных переломов трубчатых и губчатых костей. Эти переломы часто снижают ADL или качество жизни пациента и могут привести к обездвиженности. Патогенез заболевания сложный, но общие процессы включают повышенную резорбцию кости, сниженное костеобразование.

Связи между кишечной микробиотой и костной тканью обнаружены в исследованиях на мышах. По сравнению с нормальными мышами, мыши GM показали увеличение объёма трабекулярной костной ткани, причём эти параметры снижаются после колонизации [19]. Количество CD_{11b}^{+} T-клеток и клеток-предшественников остеокластов (CD_{11b}^{+}/Gr_{1}), экспрессия мРНК, кодирующей остеолитический цитокин TNF- α , снижаются в костном мозге мышей GM, причём все эти факторы ведут к снижению остеокластогенеза [19].

Кишечная микробиота повышает сывороточные концентрации инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), что способствует остеогенезу и ремоделированию костной ткани [39]. Истощение микробиоты при введении антибиотиков широкого спектра действия снижает уровни IGF-1 в сыворотке. Снижение обратимо: при добавлении КЦЖК (предполагалось, что продукция КЦЖК микробиотой через ферментацию пищевых волокон может индуцировать экспрессию IGF-1) происходит восстановление уровня IGF-1. Эти исследования свидетельствуют, что кишечная микробиота регулирует метаболизм костной ткани, хотя её влияние может различаться в зависимости от генетического фона, возраста и пола. Роль кишечной микробиоты в метаболизме костной ткани можно проанализировать, оценивая влияние пробиотиков или пребиотиков на плотность кости. В моделях на мышах эффекты кишечной микробиоты проанализированы у самцов и овариэктомированных самок (последние являются моделью постменопаузального, дефицитного по эстрогену состояния). Штаммы *Lactobacillus* увеличивают костную массу наряду с изменениями в микробиоте кишечника [40]. *Lactobacillus ruteri*, вводимая овариэктомированным мышам, защищает их от потери костной массы, возможно, путём снижения экспрессии Tgfr 5 и рецепторного реактиватора лиганда NF- κ B, которые являются маркерами активации остеокластов и резорбции кости, что ведёт к снижению остеокластогенеза. Пероральное введение *Bifidobacterium longum* на протяжении 16 недель крысам с овариэктомией, повышает костеобразование, о чем свидетельствует рост концентрации остеокальцина в сыворотке, как маркера функции остеобластов, снижение костной резорбции, о чем свидетельствуют снижение концентрации C-концевых телопептидов в сыворотке, что ведёт к увеличению плотности костей [41]. Эти эффекты опосредованы активацией генов *Bem-2* и *Sparc*, первый из которых является ключевым геном для дифференцировки остеобластов, а второй - геном, участвующим в кальцификации костной ткани.

В ряде исследований описано влияние пребиотиков на плотность кости. Пребиотики - неперевариваемые пищевые ингредиенты, которые способствуют росту по-

лезных микроорганизмов в кишечнике. Основными пребиотиками являются неперевариваемые олигосахариды, такие как фруктоолигосахариды (ФОС), галактоолигосахариды (ГОС), ксилоолигосахариды, инулин, при этом ФОС и ГОС увеличивают количество бифидобактерий в кишечнике [45]. Введение ГОС или инулина здоровым самцам крыс увеличивает всасывание кальция из кишечника, что ведёт к увеличению минерализации костной ткани и её плотности [18]. ФОС и инулин усиливают всасывание кальция в кишечнике у самцов крыс с гастрэктомией и овариэктомированных самок крыс [44]. Основной механизм, с помощью которого пребиотики увеличивают абсорбцию кальция из кишечника, может включать производство КЦЖК микробиотой путём ферментации пребиотиков, при этом показано, что КЦЖК непосредственно стимулируют абсорбцию кальция эпителием кишечника [46].

Применение пробиотиков или пребиотиков может стать новым способом профилактики и лечения остеопороза. Имеются данные свидетельствующие, что пребиотики эффективны у пациентов с постменопаузальным или сенильным остеопорозом, в одном исследовании сообщалось, что пищевые добавки кальция и ФОС оказали благотворное влияние на костную ткань женщин с постменопаузальным остеопорозом [44].

Саркопения - состояние, при котором сокращение мышечной массы сопровождается снижением мышечной функции. Причины мышечной слабости включают старение, гиподинамию, мальнутрицию, сахарный диабет [15].

Ряд исследований показали влияние кишечной микробиоты на скелетные мышцы. Метаболиты кишечной микробиоты действуют в качестве питательных веществ и модуляторов метаболизма мышечной ткани. К кишечным метаболитам относят фолат, витамин В₁₂, триптофан. Идентифицированы бактерии, участвующие в производстве каждого из питательных веществ или метаболитов [20; 21]. Предполагается, что возможные эффекты на мышечную ткань включают биосинтез аминокислот, синтез или метилирование ДНК, предотвращение окислительного стресса или повреждения эндотелия, стимуляцию анаболизма или пролиферацию клеток посредством синтеза IGF-1 [47]. Для КЦЖК (в большей степени бутирата) точкой приложения являются митохондрии мышц, что приводит к стимуляции митохондриального биогенеза посредством связывания с рецепторами жирных кислот 2 и 3 типов [48]. Бутират способствует предотвращению потери мышц и поддержанию мышечной массы посредством противовоспалительных эффектов и активации регуляторных путей, что ведёт к увеличению продукции АТФ и подавлению катаболизма мышечного белка и апоптоза миоцитов [49]. Микробный метаболит уролитин А, сохраняет биогенез митохондрий клеток скелетных мышц, улучшает работоспособность у мышей и крыс [50]. Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование показало, что пероральный приём уролитина А улучшает мышечные и митохондриальные показатели [51].

Состав кишечной микробиоты, характерный для пациентов с саркопенией, не определён. Анализ влияния пробиотиков на саркопению показал, что добавление *Lactobacillus* предотвращает уменьшение мышечной массы у мышей с острым лейкозом [52]. Лечение пожилых пациентов пребиотиками, содержащими ФОС и инулин в течение 13 недель, улучшило мышечную

функцию, о чём свидетельствует снижение утомления и улучшение показателей динамометрии [53]. Доказано, что функция и масса мышц связаны с составом кишечной микробиоты.

Атеросклероз является причиной сердечно-сосудистых заболеваний, которые приводят к снижению качества жизни и летальному исходу. Обнаружены изменения в составе кишечной микробиоты у пациентов с заболеванием атеросклерозом по сравнению со здоровыми лицами. Содержание *Collinsella* понижено у больных, в то время как уровень *Roseburia* и *Eubacterium* повышен у здоровых лиц. Количество оральных микроорганизмов *Enterobacteriaceae* и *Streptococcus spp.* повышено у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями атеросклеротического генеза с положительной корреляцией с диастолическим и систолическим артериальным давлением [54]. Количество бактерий отряда *Lactobacillales*, (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*) значительно увеличено, а количество бактерий отряда *Bacteroidetes* (*Bacteroides*, *Prevotella*) существенно снижено у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями по сравнению со здоровыми лицами [55]. У пациентов с инсультом или транзиторной ишемической атакой отмечен дисбиоз кишечника с увеличением числа условно-патогенных бактерий, таких как *Enterobacter*, *Megasphaera*, *Oscillibacter*, *Desulfovibrio* и уменьшение комменсалов, таких как *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fecalibacterium*, причём эти изменения коррелируют с тяжестью заболевания [55]. Трансплантация кишечной микробиоты у мышей ведёт к передаче восприимчивости к атеросклерозу, что напрямую свидетельствует об участии кишечной микробиоты в патогенезе данной патологии [56].

Предложен ряд механизмов, с помощью которых кишечная микробиота регулирует развитие атеросклеротической болезни. Микробиота может усиливать липидный обмен. У мышей GM отмечено снижение липолиза, бифидобактерии снижают уровень холестерина. Другой механизм связан со способностью кишечной микробиоты поддерживать кишечную проницаемость путём усиления плотных соединений кишечного эпителия. Дисбиоз кишечника увеличивает кишечную проницаемость и всасывание ЛПС в системный кровоток, вызывая хроническое системное воспаление [57].

Кишечная микробиота может играть, как защитную роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, так и стимулирующую. Микробиота кишечника продуцирует триметиламин (ТМА) из пищевого холина и L-карнитина, затем ТМА окисляется в печени, образуя триметиламин-N-оксиды (ТМАО). ТМАО индуцируют образование пенных клеток макрофагов и бляшек в аорте и коронарных артериях, при этом высокие уровни ТМАО у пациентов демонстрируют положительную корреляцию с частотой смерти от сердечно-сосудистых заболеваний или инфаркта миокарда [58].

Артериальная гипертензия является основным фактором риска развития атеросклероза и связана с дисбиозом кишечника, что показано на животных [51]. Приём антибактериальных препаратов снижает артериальное давление у пациентов с резистентностью к гипотензивной терапии [23]. Артериальная гипертензия, часто наблюдаемая у беременных женщин с ожирением, связана с изменениями в составе микробиоты кишечника, с обилием бутират-продуцирующих бактерий рода *Odoribacter*, связанного с более низким артериальным давлением [22]. Кишечная микробиота регулирует артериаль-

ное давление у людей, возможно, опосредовано взаимодействием между КЦЖК и рецепторами, связанными с G-белком, включая Gpr41 и Olfr78 [58].

Экспериментальная транзиторная ишемия головного мозга, вызванная окклюзией средней мозговой артерии у молодых и старых мышей, показало, что зондовая трансплантация фекалий от молодых мышей старым уменьшает размер инфаркта и смертность. Один из возможных механизмов этого эффекта может быть связан с увеличением выработки КЦЖК юношеской микробиотой, что сопровождается снижением уровня воспалительных цитокинов в плазме. Трансплантация микробиоты с противовоспалительным потенциалом может изменить исход инсульта и являться способом лечения этого заболевания [6].

Пробиотики влияют на артериальное давление. Введение в кишечник *Lactobacillus plantarum* уменьшает выраженность инфаркта миокарда у крыс. Эффект, как полагают, связан с метаболитами кишечных микроорганизмов [59]. Введение *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 вызывало значительное уменьшение гипертрофии левого желудочка и улучшение систолической и диастолической функции левого желудочка на модели инфаркта миокарда у крыс [60]. Представленные данные показывают, что лечебная тактика с модуляцией микробиоты кишечника может использоваться для профилактики и/или лечения церебральных и сердечно-сосудистых заболеваний, обусловленных атеросклерозом.

Кишечная микробиота – орган, играющий важную роль в обеспечении здоровья человека и в развитии различных заболеваний, в том числе и возраст ассоциированных. В схемы лечения патологии, связанной с возрастом, входят традиционные методы лечения (физические упражнения, правильное, сбалансированное питание, принципы здорового образа жизни и т. д.), но с учётом имеющихся научных данных необходимо рассмотреть возможность включения в перечень лечебных мероприятий методы управления составом и/или разнообразием кишечной микробиоты. Подобная стратегия может оказаться многообещающей для сохранения здоровья и качества жизни лиц пожилого и старческого возраста.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.4–6, 8, 11-12, 16, 18–60 см. REFERENCES)

1. Кожевников А.А., Раскина К.В., Мартынова Е.Ю. Кишечная микробиота: современные представления о видовом составе, функциях и методах исследования. *Русский медицинский журнал*. 2017; 17: 1244-7.
2. Каштанова Д.А., Ткачева О.Н., Бойцов С.А. Микробиота кишечника и факторы кардиоваскулярного риска. Часть 1. Микробиота кишечника, возраст и пол. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2015; 14(4): 92-5.
3. Лившиц К., Захарова И.Н., Дмитриева Ю.А. Влияние кишечного микробиома в норме и патологии на здоровье человека. *Медицинский совет*. 2017; 1: 155-9.
7. Каштанова Д.А., Ткачева О.Н., Бойцов С.А. Микробиота кишечника и факторы кардиоваскулярного риска. Часть 2. Микробиота кишечника и ожирение. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2015; 14(5): 83-6.
9. Ткачева О.Н., Каштанова Д.А., Бойцов С.А. Микробиота кишечника и факторы кардиоваскулярного риска. Часть 3. Липидный

- профиль, углеводный обмен и микробиота кишечника. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2015; 14(6): 83-6.
10. Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Богородская С.Л. Микробиота кишечника. Роль в развитии различных патологий. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(10): 723-6.
 13. Сиротко М.Л. Изменение и характеристика демографического старения населения. *Наука и инновации в медицине*. 2018; 4(12): 68-72.
 14. Айтбаев К.А., Мураталиев Т.М. Манипуляции с кишечной микрофлорой как новая парадигма для диагностики, терапии и профилактики кардиоваскулярных заболеваний (обзор литературы). *Вестник Кыргызско-Российского Славянского Университета*. 2015; 15(7): 10-29.
 15. Булгакова С.В., Бобошко Т.Н., Захарова Н.О., Николаева А.В., Тренева Е.В. Саркопения и метаболический синдром в гериатрии. В сб.: *Клинические и фундаментальные аспекты геронтологии*. Котельников Г.П., Булгакова С.В., ред.; Самара. Самарский государственный медицинский университет. 2017: 103-7.
 17. Волобуев А.Н., Романчук П.И., Булгакова С.В. Нейросеть «мозг-микробиота»: регуляция «висцерального» мозга и накопление когнитивной памяти. *Бюллетень науки и практики*. 2019; 5(2): 33-52.

REFERENCES

1. Kozhevnikov A.A., Raskina K.V., Martynova E.Yu. Intestinal microbiota: current understanding of species composition, functions and research methods. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 17: 1244-7. (in Russian)
2. Kashtanova D.A., Tkacheva O.N., Boitsov S.A. Gut microbiota and cardiovascular risk factors. Part 1. Gut microbiota, age and gender. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2015; 14 (4): 92-5. (in Russian)
3. Livshits K., Zakharova I.N., Dmitrieva Yu.A. Influence of the intestinal microbiome in health and disease on human health. *Meditsinskiy sovet*. 2017; 1: 155-9 (in Russian)
4. Feng Q., Chen W.D., Wang Y.D. Gut Microbiota: An Integral Moderator in Health and Disease. *Front. Microbiol*. 2018; 9: 151.
5. Messaoudi M., Violle N., Bisson J.F., Desor D., Javelot H., Rougeot C. Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes*. 2011; 2: 256-61.
6. Spychala M.S., Venna V.R., Jandzinski M., Doran S.J., Durgan D.J., Ganesh B.P. et al. Age-related changes in the gut microbiota influence systemic inflammation and stroke outcome. *Ann. Neurol*. 2018; 84: 23-36.
7. Kashtanova D.A., Tkacheva O.N., Boitsov S.A. Gut Microbiota and cardiovascular risk factors. Part 2. Gut microbiota and obesity. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2015; 14 (5): 83-6. (in Russian)
8. Minemura M., Shimizu Y. Gut microbiota and liver diseases. *World J. Gastroenterol*. 2015; 21: 1691-1702.
9. Tkacheva O.N., Kashtanova D.A., Boitsov S.A. Gut Microbiota and cardiovascular risk factors. Part 3. Lipid profile, carbohydrate metabolism and gut microbiota. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2015; 14 (6): 83-6. (in Russian)
10. Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G., Bogorodskaya S.L. Gut microbiota. Role in the development of various pathologies. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61 (10): 723-6. (in Russian)
11. Choi J., Hur T.Y., Hong Y. Influence of Altered Gut Microbiota Composition on Aging and Aging-Related Diseases. *J. Lifestyle Med*. 2018; 8: 1-7.
12. Sochocka M., Donskow-Lysoniewska K., Diniz B.S., Kurpas D., Brzozowska E., Leszek J. The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease-a Critical Review. *Mol. Neurobiol*. 2018; 56: 1841-51.
13. Sirotko M.L. Changes and characteristics of demographic ageing of the population. *Nauka i innovatsii v meditsine*. 2018; 4 (12): 68-72. (in Russian)
14. Aitbaev K.A., Murataliev T.M. Manipulations with intestinal microflora as a new paradigm for diagnosis, therapy and prevention

- of cardiovascular diseases (literature Review). *Vestnik Kyrgyzsko-Rossiyskogo slavyanskogo universiteta*. 2015; 15 (7): 10-29. (in Russian)
15. Bulgakova S.V., Boboshko T.N., Zakharova N.O., Nikolaeva A.V., Treneva E.V. Sarcopenia and metabolic syndrome in geriatrics. *Sbornik: Clinical and fundamental aspects of gerontology*. Kotelnikov G.P., Bulgakova S.V., eds. Samara: Samarskiy gosudarstvennyi meditsinskiy universitet. 2017: 103-7. (in Russian)
 16. Hu X., Wang T., Jin F. Alzheimer's disease and gut microbiota. *Sci. China Life Sci.* 2016; 59: 1006-23.
 17. Volobuev A.N., Romanchuk P.I., Bulgakova S.V. Neural Network "brain-microbiota": regulation of "visceral" brain and accumulation of cognitive memory. *Bulleten' nauki i praktiki*. 2019; 5 (2): 33-52. (in Russian)
 18. Sjögren K., Engdahl C., Henning P., Lerner U.H., Tremaroli V., Lagerquist M.K., Bäckhed F., Ohlsson C. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *J. Bone Miner. Res.* 2012; 27: 1357-67.
 19. Hernandez C.J., Guss J.D., Luna M. et al. Links Between the Microbiome and Bone. *J. Bone Miner. Res.* 2016; 31: 1638-46.
 20. Steves C.J., Bird S., Williams F.M., Spector T.D. The Microbiome and Musculoskeletal Conditions of Aging: A Review of Evidence for Impact and Potential Therapeutics. *J. Bone Miner. Res.* 2016; 31: 261-9.
 21. Ticinesi A., Lauretani F., Milani C., Nouvenne A., Tana C., Del Rio D. et al. Aging Gut Microbiota at the Cross-Road between Nutrition, Physical Frailty, and Sarcopenia: Is There a Gut-Muscle Axis? *Nutrients*. 2017; 9 (12): 1303.
 22. Gomez-Arango L.F., Barrett H.L., McIntyre H.D., Callaway L.K., Morrison M., Dekker Nitert M. Increased Systolic and Diastolic Blood Pressure Is Associated With Altered Gut Microbiota Composition and Butyrate Production in Early Pregnancy. *Hypertension*. 2016; 68: 974-81.
 23. Qi Y., Aranda J.M., Rodriguez V., Raizada M.K., Pepine C.J. Impact of antibiotics on arterial blood pressure in a patient with resistant hypertension - A case report. *Int. J. Cardiol.* 2015; 201: 157-8.
 24. Pluznick J.L. Microbial Short-Chain Fatty Acids and Blood Pressure Regulation. *Curr. Hypertens. Rep.* 2017; 19: 25.
 25. Xu R., Wang Q. Towards understanding brain-gut-microbiome connections in Alzheimer's disease. *BMC Syst. Biol.* 2016; 10 Suppl. 3: 63.
 26. Vogt N.M., Kerby R.L., Dill-McFarland K.A., Harding S.J., Merluzzi A.P., Johnson S.C. et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* 2017; 135-7.
 27. Hu X., Wang T., Jin F. Alzheimer's disease and gut microbiota. *Sci. China Life Sci.* 2016; 59: 1006-23.
 28. Köhler C.A., Maes M., Slyepchenko A., Berk M., Solmi M., Lanctôt K.L., Carvalho A.F. The Gut-Brain Axis, Including the Microbiome, Leaky Gut and Bacterial Translocation: Mechanisms and Pathophysiological Role in Alzheimer's Disease. *Curr. Pharm. Des.* 2016; 22: 6152-66.
 29. Fung T.C., Olson C.A., Hsiao E.Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat. Neurosci.* 2017; 20: 145-55.
 30. Bronzuoli M.R., Iacomino A., Steardo L., Scuderi C. Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J. Inflamm. Res.* 2016; 9: 199-208.
 31. Diaz Heijtz R., Wang S., Anuar F., Qian Y., Björkholm B., Samuelsson A., Hibberd M.L., Forsberg H., Pettersson S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108: 3047-52.
 32. Gareau M.G., Wine E., Rodrigues D.M., Cho J.H., Whary M.T., Philpott D.J. et al. Bacterial infection causes stress induced memory dysfunction in mice. *Gut*. 2011; 60: 307-17.
 33. Harach T., Marungruang N., Duthilleul N., Cheatham V., Mc Coy K. D., Frisoni G. et al. Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. *Sci. Rep.* 2017; 7: 41802.
 34. Bourassa M.W., Alim I., Bultman S.J., Ratan R.R. Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? *Neurosci. Lett.* 2016; 625: 56-63.
 35. Govindarajan N., Agis-Balboa R.C., Walter J., Sananbenesi F., Fischer A. Sodium butyrate improves memory function in an Alzheimer's disease mouse model when administered at an advanced stage of disease progression. *J. Alzheimers Dis.* 2011; 26: 187-97.
 36. Nguyen T., Fujimura Y., Mimura I., Fujii Y., Nguyen N.L., Arakawa K., Morita H. Cultivable butyrate-producing bacteria of elderly Japanese diagnosed with Alzheimer's disease. *J. Microbiol.* 2018; 56: 760-71.
 37. Fox M., Knapp L.A., Andrews P.W., Fincher C.L. Hygiene and the world distribution of Alzheimer's disease: Epidemiological evidence for a relationship between microbial environment and age-adjusted disease burden. *Evol. Med. Public. Health.* 2013; 2013: 173-86.
 38. Kobayashi Y., Sugahara H., Shimada K. Therapeutic potential of Bifidobacterium breve strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* 2017; 7: 13510.
 39. Yan J., Herzog J.W., Tsang K., Brennan C.A., Bower M.A., Garrett W.S. et al. Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016; 113: E7554-63.
 40. Britton R.A., Irwin R., Quach D., Schaefer L., Zhang J., Lee T. et al. Probiotic *L. reuteri* treatment prevents bone loss in a menopausal ovariectomized mouse model. *J. Cell Physiol.* 2014; 229: 1822-30.
 41. Parvaneh K., Ebrahimi M., Sabran M.R., Karimi G., Ng Min Hwei A., Abdul-Majeed S. et al. Probiotics (*Bifidobacterium longum*) Increase Bone Mass Density and Upregulate Sparc and Bmp-2 Genes in Rats with Bone Loss Resulting from Ovariectomy. *Biomed Res. Int.* 2015; 2015: 897639.
 42. Weaver C.M. Diet, gut microbiome, and bone health. *Curr Osteoporos Rep* 2015; 13: 125-30.
 43. Roberfroid M.B., Cumps J., Devogelaer J.P. Dietary chicory inulin increases whole-body bone mineral density in growing male rats. *J. Nutr.* 2002; 132: 3599-3602.
 44. Zafar T.A., Weaver C.M., Zhao Y., Martin B.R., Wastney M.E. Nondigestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. *J. Nutr.* 2004; 134: 399-402.
 45. Slevin M.M., Allsopp P.J., Magee P.J., Bonham M.P., Naughton V.R., Strain J.J. et al. Supplementation with calcium and short-chain fructo-oligosaccharides affects markers of bone turnover but not bone mineral density in postmenopausal women. *J. Nutr.* 2014; 144: 297-304.
 46. Zhang J., Lu Y., Wang Y., Ren X., Han J. The impact of the intestinal microbiome on bone health. *Intractable Rare Dis. Res.* 2018; Aug; 7(3):148-55.
 47. Lin R., Liu W., Piao M., Zhu H. A review of the relationship between the gut microbiota and amino acid metabolism. *Amino Acids.* 2017; 49: 2083-90.
 48. den Besten G., van Eunen K., Groen A.K., Venema K., Reijngoud D.J., Bakker B.M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 2013; 54: 2325-40.
 49. Walsh M.E., Bhattacharya A., Sataranatarajan K. The histone deacetylase inhibitor butyrate improves metabolism and reduces muscle atrophy during aging. *Aging Cell.* 2015; 14: 957-70.
 50. Ryu D., Mouchiroud L., Andreux P.A. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nat. Med.* 2016; 22: 879-88.
 51. Tang W.H., Kitai T., Hazen S.L. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ. Res.* 2017; 120: 1183-96.
 52. Bindels L.B., Beck R., Schakman O., Martin J.C., De Backer F., Sohet F.M. et al. Restoring specific lactobacilli levels decreases inflammation and muscle atrophy markers in an acute leukemia mouse model. *PLoS One.* 2012; 7: e37971.
 53. Buigues C., Fernández-Garrido J., Pruijboom L., Hoogland A.J., Navarro-Martínez R., Martínez-Martínez M. et al. Effect of a Prebiotic Formulation on Frailty Syndrome: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17.
 54. Jie Z., Xia H., Zhong S.L., Feng Q., Li S., Liang S. et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat. Commun.* 2017; 8: 845.

55. Yin J., Liao S.X., He Y., Wang S., Xia G.H., Liu F.T. et al. Dysbiosis of Gut Microbiota With Reduced Trimethylamine-N-Oxide Level in Patients With Large-Artery Atherosclerotic Stroke or Transient Ischemic Attack. *J. Am. Heart Assoc.* 2015; 4 (11): e002699.
56. Gregory J.C., Buffa J.A., Org E., Wang Z., Levison B.S., Zhu W. et al. Transmission of atherosclerosis susceptibility with gut microbial transplantation. *J. Biol. Chem.* 2015; 290: 5647-60.
57. Bäckhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101: 15718-23.
58. Tang W.H., Wang Z., Levison B.S., Koeth R.A., Britt E.B., Fu X. et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368: 1575-84.
59. Lam V., Su J., Hsu A., Gross G.J., Salzman N.H., Baker J.E. et al. Intestinal Microbial Metabolites Are Linked to Severity of Myocardial Infarction in Rats. *PLoS One.* 2016; 11: e0160840.
60. Gan X.T., Ettinger G., Huang C.X., Burton J.P., Haist J.V., Rajapurohitam V. et al. Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat. *Circ. Heart Fail.* 2014; 7: 491-9.

Поступила 05.03.19
Принята к печати 28.03.19

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**

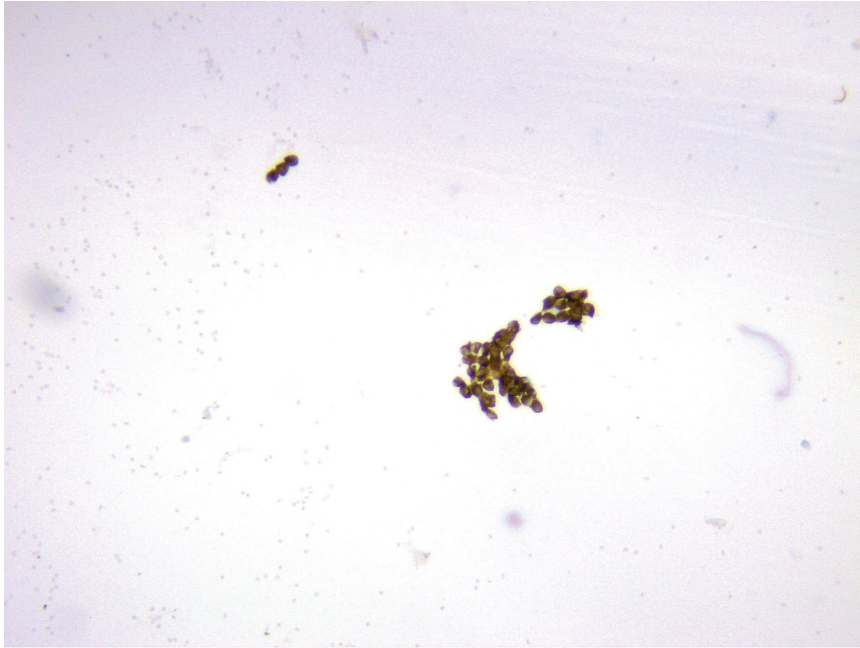


Рис. 1. Положительная экспрессия СК7 в клетках мезотелия. Об.х10.

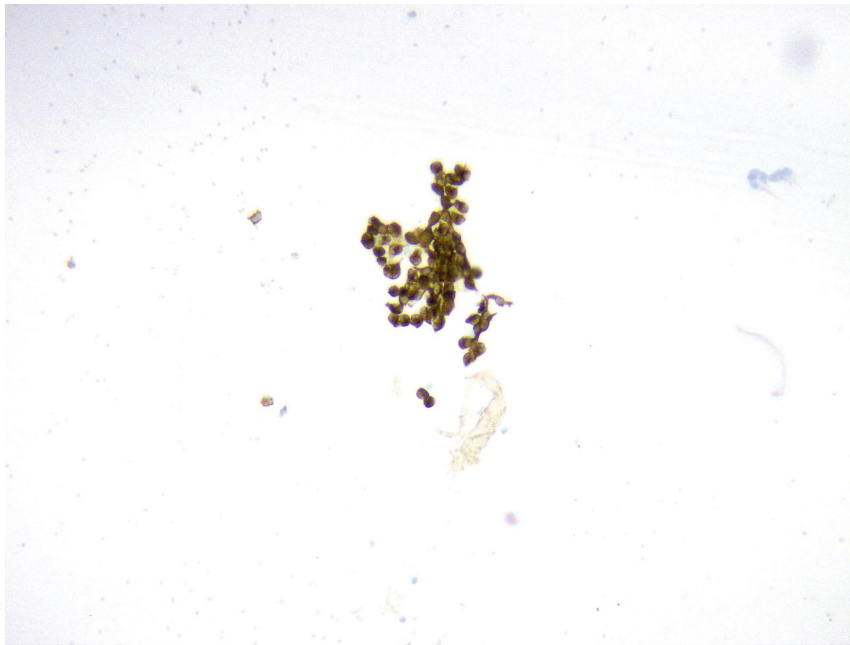


Рис. 2. Положительная экспрессия СК7 в клетках мезотелия. Об.х10.

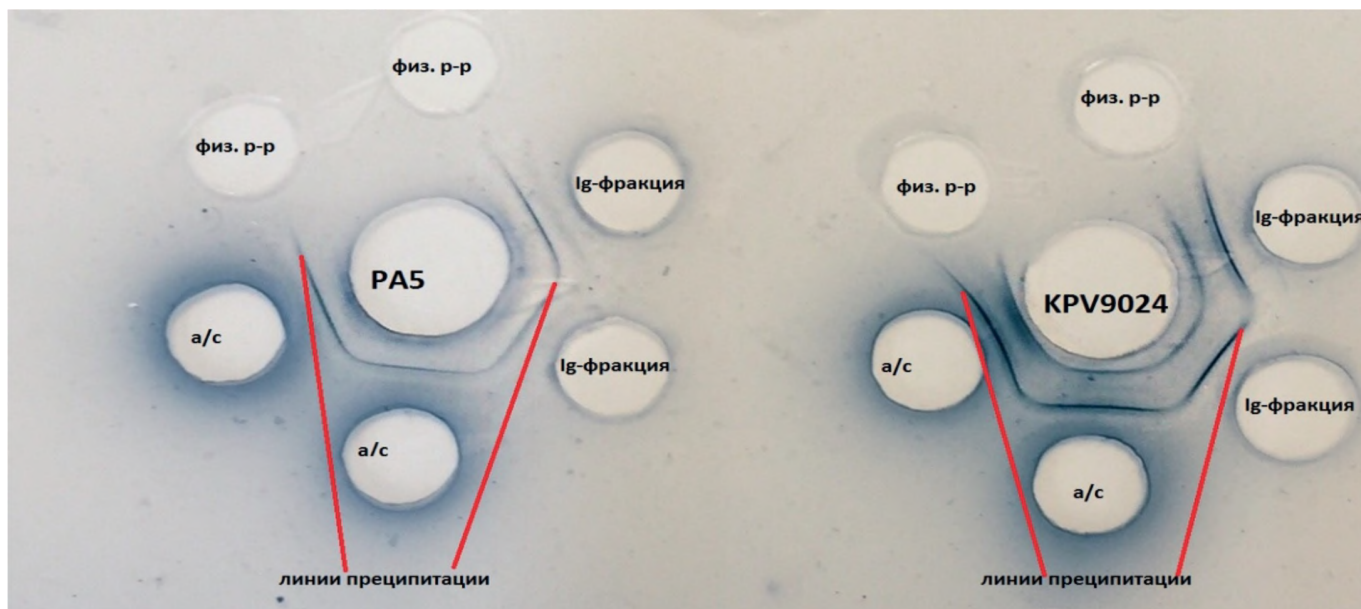


Рис. 1. Иммунохимическая характеристика антифаговых сывороток и выделенных из них Ig-фракций с помощью иммунопреципитации по Оухтерлони (центральные лунки – фаги РА5 и КРV9024 в титре 10^{10} БОЕ/мл, периферические лунки – соответствующие кроличьи моноспецифические антисыворотки к фагам, соответствующие Ig-фракции, физиологический раствор)

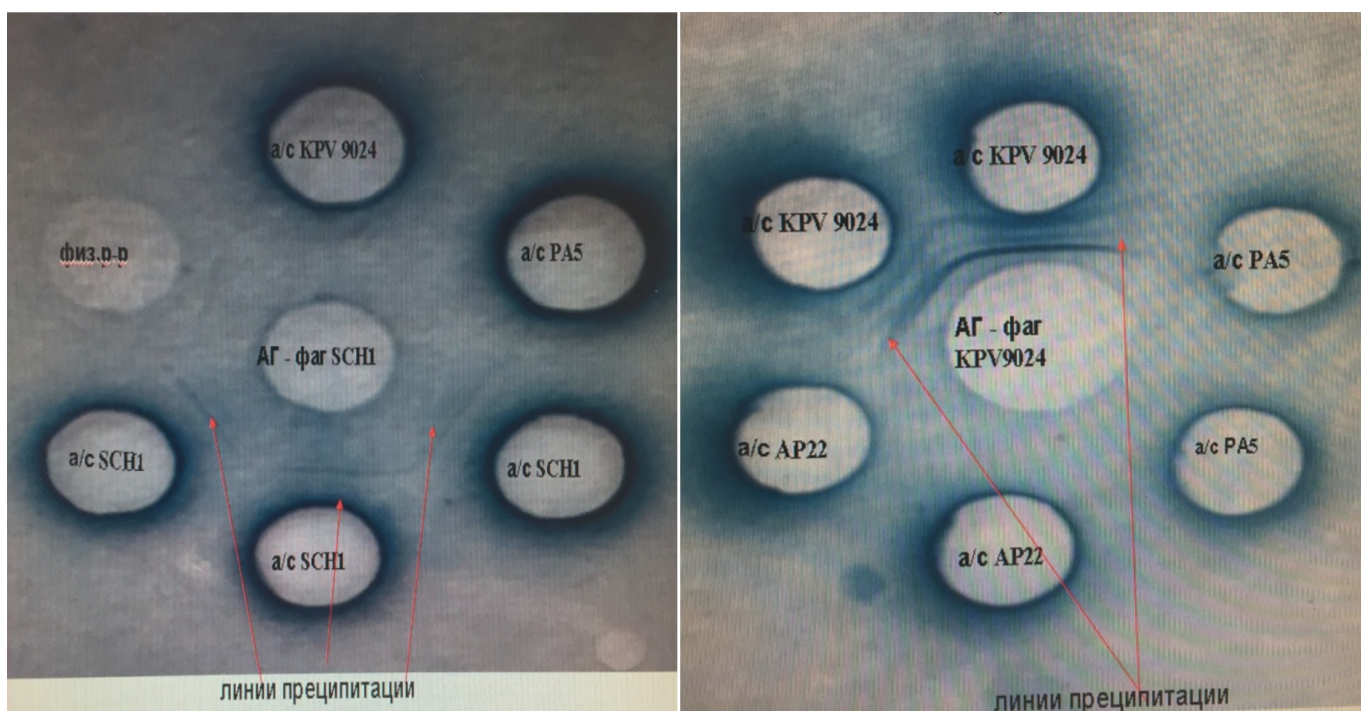


Рис. 2. Проверка специфичности антисывороток к фагу SCH1, лизирующему *S. aureus*, и фагу KPV9024, лизирующему *K. pneumoniae*, методом иммунопреципитации по Оухтерлони (центральные лунки – фаг SCH1 или фаг KPV9024 в титре 10^{10} БОЕ/мл, периферические лунки – кроличьи моноспецифические антисыворотки к фагам SCH1, KPV9024, PA5, AP22, физиологический раствор).