

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

5 • 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

МАЙ

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](mailto: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 × 88<sup>1</sup>/<sub>8</sub>.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Уч.-изд. л. 9,67.

**E-mail: [oao-meditsina@mail.ru](mailto:oao-meditsina@mail.ru)**

**WWW страница: [www.medlit.ru](http://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](http://www.wakc.ru),**

**[www.pressa-rt.ru](http://www.pressa-rt.ru)**

**Подписка на электронную версию:  
[elibrary.ru](http://elibrary.ru)**

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.  
2019. № 5. 257–320.

**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  
5 • 2019

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

MAY

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](mailto: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](mailto:oao-meditsina@mail.ru)**

**WWW page: [www.medlit.ru](http://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**

- Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Михельсон А.А., Никашина А.А., Михельсон А.Ф., Лебеденко Е.Ю. Активность ферментов метаболизма аминокислот в плаценте в разные сроки физиологической и осложненной беременности . . . . . 260
- Бельская Л.В., Косенок В.К., Постнова Т.В. Процессы липопероксидации и эндогенной интоксикации в слюне при центральном и периферическом раке легкого . . . . . 265
- Духовская Н.Е., Вавилова Т.П., Горбачева С.Ю., Гремякова П.В., Островская И.Г. Применение метода жидкостной хромато-масс-спектрометрии для определения бисопролола и аторвастатина в слюне . . . . . 271

**ГЕМАТОЛОГИЯ**

- Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В., Соменова О.В., Елизарова А.Л., Добровольская М.М. Современные метаболиты феррокинетики в диагностике анемического синдрома у больных с распространенными стадиями лимфомы Ходжкина при проведении интенсивной химиотерапии . . . . . 277

**ЦИТОЛОГИЯ**

- Сарибекян Э.К., Зикиржоджаев А.Д., Славнова Е.Н., Бруслинская А.Б., Суркова В.С., Ортабаева Д.Р., Петров А.Н. Возможности цитологической диагностики лактирующей аденомы молочной железы (клиническое наблюдение) . . . . . 284

**ИММУНОЛОГИЯ**

- Карзакова Л.М., Кудряшов С.И., Шестипалова М.В., Леонтьева Е.В. Определение уровней цитокинов в моче в клинической практике . . . . . 287

**МИКРОБИОЛОГИЯ**

- Абаев И.В., Скрябин Ю.П., Коробова О.В., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Сравнение гемолитической активности и генов гемолитических токсинов клинических штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных на территории РФ. 294
- Фурсов М.В., Дятлов И.А., Потанов В.Д. Модели покоящегося состояния *Mycobacterium tuberculosis in vitro* и латентной туберкулезной инфекции *in vivo* . . . . . 299
- Чеснокова М.Г., Чесноков В.А., Миронов А.Ю. Применение сканирующей электронной микроскопии с целью изучения биоплёнок *Candida albicans* на поверхности базисных пластмасс съёмных ортопедических конструкций . . . . . 308
- Лахтин В.М., Лахтин М.В., Миронов А.Ю., Алёшкин В.А., Афанасьев С.С. Лектиновые популяции NK-клеток против вирусассоциированных опухолей (обзор литературы) 314

**BIOCHEMISTRY**

- Pogorelova T.N., Gunko V.O., Mikhelson A.A., Nikashina A.A., Mikhelson A.F., Lebedenko E.Yu. The activity of enzymes of amino acid metabolism of the placenta in different terms of the physiological and complicated pregnancy 260
- Bel'skaya L.V., Kosenok V.K., Postnova T.V. The processes of lipoperoxidation and endogenous intoxication in saliva in central and peripheral lung cancer 265
- Dukhovskaya N.E., Vavilova T.P., Gorbacheva S.Yu., Gremyakova P.V., Ostrovskaya I.G. Application of the method of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of bisoprolol and atorvastatin 271

**HEMATOLOGY**

- Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V., Somonova O.V., Elizarova A.L., Dobrovolskaya M.M. Modern ferrokinetics metabolites in the diagnostics of anemic in patients with disseminated stages of Hodgkin's lymphoma when conducting intensive chemotherapy 277

**CYTOLOGY**

- Saribekyan E.K., Zikirjakhodzaev A.D., Bruslinskaya A.B., Surkova V.S., E.N.Slavnova, Ortabaeva D.R., Petrov A.N. Possibilities of cytological diagnostics of lactated breast adenoma (clinical report) 284

**IMMUNOLOGY**

- Karzakova L.M., S. Kudryashov S.I., Shestipalova M.V., E. Leontyeva E.V. Determining of cytokine levels in the urine in clinical practice 287

**MICROBIOLOGY**

- Abaev I.V., Skryabin Y.P., Korobova O.V., Polosenko O.V., Shepelin A.P. Comparison of hemolytic activity and hemolytic toxin genes of *Staphylococcus aureus* clinical strains, isolated in Russia 294
- Fursov M.V., Dyatlov I.A., Potapov V.D. *In vitro* models of *Mycobacterium tuberculosis* dormancy, and *in vivo* models of latent tuberculosis infection 299
- Chesnokova M.G., Chesnokov V.A., Mironov A.Yu. Application of scanning electronic microscopy for the purpose of studying *Candida albicans* biofilm on the surface of basic plastics of removable orthopedic designs 308
- Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Mironov A.Yu., Aleshkin V.A., Afanasiev S.S. Lectin populations of NK cells against viruses-associated tumors (review of literature) 314

## БИОХИМИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Михельсон А.А., Никашина А.А., Михельсон А.Ф., Лебедеко Е.Ю.

### АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА АМИНОКИСЛОТ В ПЛАЦЕНТЕ В РАЗНЫЕ СРОКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 344012, Ростов-на-Дону, Россия

С помощью методов спектрофотометрии и ионообменной хроматографии оценена активность ферментов метаболизма аминокислот и содержание свободных аминокислот в ткани плаценты при физиологической беременности и плацентарной недостаточности (ПН). Установлено, что при ПН плацентарная активность ферментов: аланин-, цистеин-, тирозин-, глутаминаминотрансфераз, глутаминсинтетазы, глутаматдегидрогеназы снижается в разные сроки гестации. Противоположные отклонения имеют место для аспаратаминотрансферазы и глутаминазы. Аналогичная направленность изменений характерна и для аминокислот: аспарагиновой, глутаминовой, глутамина, аланина, цистеина, тирозина, аргинина. Между активностью ферментов и содержанием аминокислот выявлена корреляционная зависимость. Разные сроки беременности характеризует разная выраженность изменений, особенно во втором триместре, который отличается наиболее интенсивным ростом и развитием плода в связи с повышенным спросом в трофическом материале. Выявленные изменения, очевидно, имеют патогенетическое значение в формировании и развитии ПН.

**Ключевые слова:** активность ферментов аминокислотного обмена; свободные аминокислоты; плацента; плацентарная недостаточность.

**Для цитирования:** Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Михельсон А.А., Никашина А.А., Михельсон А.Ф., Лебедеко Е.Ю. Активность ферментов аминокислотного обмена плаценты в разные сроки физиологической и осложненной беременности. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(5): 260-264.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-260-264>

Pogorelova T.N., Gunko V.O., Mikhelson A.A., Nikashina A.A., Mikhelson A.F., Lebedenko E.Yu.

#### THE ACTIVITY OF ENZYMES OF AMINO ACID METABOLISM OF THE PLACENTA IN DIFFERENT TERMS OF THE PHYSIOLOGICAL AND COMPLICATED PREGNANCY

Rostov State Medical University, 344022, Rostov-on-Don, Russia

The activity of amino acid metabolism enzymes and the content of free amino acids in the placenta during physiological pregnancy and placental insufficiency (PI) were studied using spectrophotometric methods and ion-exchange chromatography. It was found that in PI placental activity of the studied enzymes: alanine-, cysteine-, tyrosine-, glutamino- transferase, glutathione synthetase, glutamate dehydrogenase decreases at different periods of gestation. The opposite variations occur for aspartataminotranferase and glutaminase. Similar changes are detected for amino acids synthesized or used in the course of appropriate reactions: aspartic acid, glutamic acid, glutamine, alanine, cysteine, tyrosine, arginine. The correlation between enzyme activity and amino acid content was revealed. Different periods of pregnancy are characterized by varying degrees of change, especially expressed in the second trimester, characterized by the most intense growth and development of the fetus, and its increased needs for trophic material. The revealed changes obviously play a pathogenetic role in the formation and further development of PI.

**Key words:** activity of amino acid metabolism enzymes; free amino acids; placenta; placental insufficiency.

**For citation:** Pogorelova T.N., Gunko V.O., Mikhelson A.A., Nikashina A.A., Mikhelson A.F., Lebedenko E.Yu. The activity of enzymes of amino acid metabolism of the placenta in different terms of the physiological and complicated pregnancy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (5): 260-264 (in Russ.)  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-260-264>

**For correspondence:** Pogorelova Tatyana Nikolaevna, Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher of Department of Biomedical Problems in Obstetrics, Gynecology and Pediatrics; e-mail: [tnp.miiap@yandex.ru](mailto:tnp.miiap@yandex.ru)

#### Information about authors:

Pogorelova T.N.: <https://orcid.org/0000-0002-0400-0652>  
Gunko V.O.: <https://orcid.org/0000-0001-8607-9052>  
Mikhelson A.A.: <https://orcid.org/0000-0002-8282-2248>

Mikhelson A.F.: <https://orcid.org/0000-0002-6792-0982>  
Nikashina A.A.: <https://orcid.org/0000-0001-8099-9093>  
Lebedenko E.Yu.: <https://orcid.org/0000-0003-2602-1486>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 30.03.2019  
Accepted 04.04.2019

**Для корреспонденции:** Погорелова Татьяна Николаевна, д-р биол. наук, проф., гл. науч. сотр. отдела медико-биологических проблем в акушерстве, гинекологии и педиатрии; e-mail: [tnp.miiap@yandex.ru](mailto:tnp.miiap@yandex.ru)

*Введение.* Внутритробный период онтогенеза сопровождаются глубокими биохимическими изменениями не только в организме матери, но и в плаценте, которая во многом обеспечивает реализацию биологической функции гомеостаза в системе мать-плацента-плод, как следствие, нормальное течение беременности и развитие плода. Необходимость обеспечения физиологического роста и развития плода значительно повышает его потребность в пластическом материале, важной частью которого являются свободные аминокислоты. Им принадлежит особая роль в широком спектре метаболических превращений, затрагивающих в том числе и молекулярный уровень регуляции [1]. Многочисленные химические реакции, в которых участвуют аминокислоты, перерабатывая и реализуя внешнюю информацию, осуществимы с помощью разных ферментов, которые нередко объединяют метаболизм аминокислот с реакциями выработки энергии, синтезом АТФ [2]. Важно отметить, что трансплацентарный переход аминокислот от матери к плаценте и от плаценты к плоду влияет на внутритробное программирование постнатальной патологии [3]. Последствия метаболических повреждений в плаценте в процессе гестации обнаруживаются у новорожденных, а также в отдаленные этапы у детей младшего возраста и даже во взрослом возрасте [4].

Возникновение нарушений в течение перинатального периода наиболее часто обусловлено развитием дисфункции плаценты. В ранее проведенной работе по оценке метаболизма аминокислот матери и плода при плацентарной недостаточности (ПН) выявлены значительные изменения относительно аналогичных показателей в норме [5]. Однако представляет интерес оценка состава аминокислот и особенно активности ферментов их метаболизма в самой плаценте, как основном органе, отклонения функционально-метаболического состояния которого приводят к последующим нарушениям во взаимоотношениях между организмами матери и плода. В то же время сведения об активности ферментов метаболизма аминокислот в плаценте весьма малочисленны и касаются лишь обмена одной или двух аминокислот [6]. В связи с этим, целью работы явилось определение активности плацентарных ферментов аминокислот, которые обладают наиболее важными регуляторными функциями, в сопоставлении с содержанием аминокислот при ПН и оценка влияния их модификации на формирование осложненной беременности.

*Материал и методы.* В исследование мы включали 80 женщин 22–29 летнего возраста. 1 группа – 20 практически здоровых женщин с неосложненной беременностью и своевременными родами (39–40 недель). Во 2-ю группу вошли 17 клинически здоровых женщин с неосложненной беременностью, которая была прервана в результате искусственного аборта по желанию женщины в период с 8 до 12 недель. У 6 женщин неосложненная беременность была прервана в результате острого травматического повреждения матери в 16–20 недель (3-я группа). 4-ю группу составили 16 женщин с ПН, доносившие беременность (39–40 недель). 5-я группа включала 10 пациенток с ПН, беременность которых самопроизвольно прервалась в 8–12 недель, и 6-ю группу составили 11 женщин с диагностированной ПН во время беременности, самопроизвольно прервавшейся в 16–20 недель.

Диагноз ПН был поставлен на основании комплексного клиничко-лабораторного обследования, которое включало ультразвуковую фетометрию, доплерометрию маточно-плацентарно-плодового кровотока, кардиотокографию. По возрасту, индексу массы тела, паритету

беременностей и родов, экстрагенитальной патологии обследуемые группы беременных были сопоставимы. Все женщины дали информированное согласие на расширенный алгоритм обследования. Критериями исключения из исследования служили декомпенсированные формы соматических заболеваний, аутоиммунная патология, многоплодная беременность, применение пациентками препаратов глутаминовой кислоты. Критерии включения в исследование – возраст женщин до 30 лет, отсутствие признаков преэклампсии и задержки роста плода. У пациенток обеих групп питание было полноценным и сбалансированным по основным ингредиентам, в том числе по белковому компоненту.

Материалом для исследования служила ткань плаценты. Образцы плаценты получали сразу после родов при соблюдении холодового режима ( $t=+2+4^{\circ}\text{C}$ ). Для проведения исследования брали центральную часть макроскопически нормальных участков плацентарного диска, включая плодовую и материнскую поверхность (без кровоизлияний, кальцификации, некроза, отложенной фибрина), не затрагивая крупных сосудов. Вырезанные образцы (10 г) промывали охлажденным физиологическим раствором для удаления остатков крови и амниотической жидкости, затем гомогенизировали (при  $t=+2+4^{\circ}\text{C}$ ) с помощью гомогенизатора Ultra-Turrax (IKA, Германия) в PBS-буфере.

В экстрактах, полученных из плацентарной ткани, определяли активность аспаргат- (АСТ, КФ 2.6.1.1), аланин- (АЛТ, КФ 2.6.1.2), цистеин- (Цис-Т, КФ 2.6.1.3), тирозин- (Тир-Т, КФ 2.6.1.5) аминотрансфераз по приросту содержания глутаминовой кислоты после инкубации соответствующей аминокислоты с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой. Инкубационные смеси содержали 10 мМ фосфатный буфер (рН 7,4), 0,5 мМ  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту, 1,0 мМ концентрации соответствующей аминокислоты, 100 мкг белка. Активность глутамин-кетокислотной аминотрансферазы (ГКТ, КФ 2.6.1.15) определяли по накоплению количества аммиака, оцененного спектрофотометрическим методом с помощью классической реакции неселеризации (при 430 нм). В состав инкубационной смеси входили: 1,0 мМ глутамин, 1,0 мМ щавелевоуксусная кислота, 10 мМ фосфатный буфер (рН 8,3), 100 мкг белка. Об активности фосфат-активируемой глутаминазы (ФАГ; КФ 3.5.1.2) судили по снижению количества глутамината. Инкубационная смесь содержала 1,0 мМ глутамин, 10 мМ калий-фосфатный буфер (рН 8,1), 100 мкг белка. Активность глутаминсинтетазы (ГС; КФ 6.3.1.2) оценивали по приросту содержания глутамината. Основные компоненты инкубационной смеси: 2,0 мМ глутамат натрия, 0,5 мМ АТФ, 1,5 мМ трис-НСl буфер (рН 7,2), 1,0 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 100 мкг белка. Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.1.3) определяли по приросту восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NAD) при 340 нм. Инкубационная смесь содержала 10 мМ фосфатный буфер (рН 7,8), 5 мМ глутамат натрия, 0,5 мМ NAD, 100 мкг белка. Содержание образовавшихся глутаминовой кислоты и ее амида – глутамината, как и уровень свободных аминокислот, измеряли на автоматическом анализаторе ААА-400 («Microtechno», Чехия). Подготовку проб и анализ проводили согласно инструкции к анализатору по стандартной программе с использованием трех натрий-цитратных буферных растворов с рН: 3,25, 4,25, 5,28. На каждую хроматографическую колонку анализатора наносили 0,3 мл проб. Скорость тока 70 мл/час. Идентификация

**Активность ферментов метаболизма аминокислот плаценты в разные сроки физиологической беременности и при плацентарной недостаточности**

Показатель (нмоль/мин×мг белка)	Физиологическая беременность, нед			Плацентарная недостаточность, нед			p
	8–12	16–20	39–40	8–12	16–20	39–40	
АСТ	6,02±0,36 [5,31-6,73]	9,14±0,54 [8,08-10,20]	6,01±0,43 [5,17-6,85]	7,28±0,46 [6,38-8,18]	13,1±0,81 [11,51-14,69]	8,31±0,51 [7,31-9,31]	$p_1=0,042$ $p_2=0,004$ $p_3=0,001$
АЛТ	1,05±0,06 [0,93-1,17]	2,07±0,17 [1,74-2,40]	1,45±0,11 [1,23-1,67]	0,86±0,05 [0,76-0,96]	1,38±0,09 [1,2-1,56]	0,99±0,07 [0,85-1,13]	$p_1=0,040$ $p_2=0,001$ $p_3=0,002$
ЦитТ	0,34±0,02 [0,30-0,38]	0,64±0,05 [0,54-0,74]	0,40±0,03 [0,34-0,46]	0,26±0,02 [0,22-0,3]	0,48±0,04 [0,4-0,56]	0,31±0,02 [0,27-0,35]	$p_1=0,014$ $p_2=0,028$ $p_3=0,024$
ГКТ	0,61±0,04 [0,53-0,69]	1,22±0,11 [1,10-1,44]	0,92±0,06 [0,8-1,04]	0,49±0,03 [0,43-0,55]	0,81±0,05 [0,71-0,91]	0,72±0,05 [0,62-0,82]	$p_1=0,046$ $p_2=0,001$ $p_3=0,018$
ФАГ	1,36±0,09 [1,18-1,54]	1,64±0,11 [1,42-1,86]	1,36±0,09 [1,18-1,54]	1,72±0,12 [1,48-1,96]	2,37±0,17 [2,04-2,70]	1,85±0,13 [1,60-2,10]	$p_1=0,023$ $p_2=0,010$ $p_3=0,003$
ГС	1,62±0,10 [1,42-1,82]	2,36±0,18 [2,01-2,71]	1,84±0,14 [1,57-2,11]	1,31±0,08 [1,15-1,77]	1,55±0,12 [1,31-1,79]	1,41±0,09 [1,23-1,59]	$p_1=0,042$ $p_2=0,002$ $p_3=0,020$
ГДГ	4,71±0,29 [4,14-5,28]	6,82±0,55 [5,74-7,90]	5,12±0,39 [4,36-5,88]	3,84±0,23 [3,39-4,29]	4,51±0,32 [3,88-5,14]	3,63±0,27 [3,1-4,16]	$p_1=0,048$ $p_2=0,001$ $p_3=0,005$

Примечание. Здесь и в табл. 2:  $p_1$  – достоверность различий между показателями при физиологической беременности и плацентарной недостаточности в 8-12 недель;  $p_2$  – достоверность различий между показателями при физиологической беременности и плацентарной недостаточности в 16-20 недель;  $p_3$  – достоверность различий между показателями при физиологической беременности и плацентарной недостаточности в 39-40 недель. Данные представлены в виде средней величины ± ошибка среднего (в скобках – 95% доверительный интервал).

аминокислот, расчет площадей пиков и определение концентрации осуществляли по результатам анализа соответствующих стандартов (“Sigma-Aldrich”, США) для калибровки прибора. Об активности аргиназы (КФ 3.5.3.1) судили по её способности превращать аргинин в мочевины. Инкубационная смесь содержала: 10 мМ фосфатный буфер (рН 9,5), 100 мМ  $MnCl_2$ , 10 мМ аргинин, 100 мкг белка. Содержание образовавшейся мочевины оценивали с помощью коммерческих наборов “Новокарб” (“Вектор-Бест”, Россия). Один из основных субстратов в контрольные пробы добавляли после окончания инкубации. Время инкубации 30 мин. Результаты относили к 1 мг белка. Содержание белка определяли с помощью коммерческого набора (“Bio-Rad”, США).

Статистическую обработку данных проводили, используя лицензионный пакет программ Statistica 6.0. (“StatSoft Inc.”). Степень соответствия данных нормальному распределению оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Однородность дисперсий проверяли по критерию Фишера. Статистическую значимость различий между сравниваемыми показателями определяли по критерию Стьюдента (t-критерий). Корреляционный анализ выполнен с использованием критерия Пирсона с расчётом коэффициента корреляции (r). Результаты оценивали как статистически значимые при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Полученные результаты свидетельствуют, что развитие ПН происходит на фоне измененной активности ферментов метаболизма аминокислот плаценты уже с первого триместра беременности (табл. 1). Среди оцененных ферментов увеличение активности при ПН обнаружено только для АСТ и ФАГ, причем наибольшая степень отклонения имеет место в 16-20 нед беременности. Если в этот период активность АСТ

при осложненной беременности возрастает на 43,3%, то в первом триместре (8-12 нед) – только на 16,1%. При доношенной беременности на фоне ПН степень увеличения равна 38,2%. Для ФАГ увеличение в первом триместре составляет 16,2%, во втором – 35,4%, в третьем – 25,2% относительно контрольных величин. Активность остальных изученных ферментов снижается в различной степени, однако наиболее выраженные отклонения также имеют место в середине гестации. В 8-12 нед активность АЛТ уменьшается на 18,6%, Цит-Т – на 23,0%, Тир-Т – на 18,5%, ГКТ – на 18,8%, ГС – на 19,2%, ГДГ – на 29,1%. В 16-20 недель активность этих ферментов при ПН снижается примерно одинаково на 33-34%. В доношенной плаценте уменьшение активности ферментов более выражено, чем в I триместре, но менее, чем в середине беременности и составляет для АЛТ – 31,7%, Цит-Т – 22,5%. Тир-Т – 27,2%, ГКТ – 21,7%, ГС – 23,4% и ГДГ – 29,1%. Следует отметить, что не только при ПН, но и при нормальной беременности в 16-20 нед установлена наиболее высокая ферментативная активность. Что касается аргиназы, то ее активность определяли в плаценте лишь в 39-40 недель. В этот период осложненной беременности она была ниже относительно физиологического показателя на 29,2%.

Чтобы оценить влияние нарушения активности ферментов на состав аминокислот плаценты, определено содержание свободных аминокислот, которые синтезируются или используются как субстраты в ходе реакций, катализируемых указанными ферментами (табл. 2). Уже в сроки 8-12 недель содержание этих аминокислот в плаценте при ПН отличается от таковых при физиологической беременности. Для глутаминовой и аспарагиновой кислот имеет место повышение их количества

Таблица 2

**Содержание свободных аминокислот в плаценте в разные сроки физиологической беременности и при плацентарной недостаточности**

Аминокислоты (мкмоль/г ткани)	Физиологическая беременность, недели			Плацентарная недостаточность, недели			p
	8-12	16-20	39-40	8-12	16-20	39-40	
Глутаминовая кислота	1,72±0,09 [1,54-1,90]	3,94±0,28 [3,39-4,49]	2,15±0,15 [1,86-2,44]	2,05±0,12 [1,81-2,29]	5,38±0,32 [4,75-6,01]	2,70±0,17 [2,37-3,03]	p <sub>1</sub> =0,036 p <sub>2</sub> =0,009 p <sub>3</sub> =0,021
Аспарагиновая кислота	0,93±0,03 [0,87-0,99]	2,36±0,17 [2,03-2,69]	1,25±0,08 [1,09-1,41]	1,12±0,06 [1,0-1,24]	3,33±0,21 [2,92-3,74]	1,65±0,09 [1,47-1,83]	p <sub>1</sub> =0,004 p <sub>2</sub> =0,007 p <sub>3</sub> =0,002
Аланин	0,52±0,03 [0,46-0,58]	1,15±0,11 [0,93-1,37]	0,92±0,06 [0,8-1,04]	0,42±0,03 [0,36-0,48]	0,75±0,05 [0,65-0,85]	0,66±0,05 [0,56-0,76]	p <sub>1</sub> =0,037 p <sub>2</sub> =0,002 p <sub>3</sub> =0,003
Тирозин	0,38±0,02 [0,34-0,42]	0,69±0,05 [0,59-0,79]	0,43±0,03 [0,37-0,49]	0,29±0,02 [0,25-0,33]	0,47±0,04 [0,39-0,55]	0,32±0,02 [0,28-0,36]	p <sub>1</sub> =0,007 p <sub>2</sub> =0,004 p <sub>3</sub> =0,007
Цистеин	0,48±0,03 [0,42-0,54]	0,76±0,08 [0,60-0,92]	0,52±0,04 [0,44-0,60]	0,37±0,03 [0,31-0,43]	0,44±0,04 [0,36-0,52]	0,33±0,03 [0,27-0,39]	p <sub>1</sub> =0,023 p <sub>2</sub> =0,001 p <sub>3</sub> =0,003
Глутамин	0,53±0,03 [0,47-0,59]	1,24±0,10 [1,04-1,44]	0,61±0,04 [0,53-0,69]	0,42±0,03 [0,36-0,48]	0,81±0,06 [0,69-0,93]	0,44±0,04 [0,36-0,52]	p <sub>1</sub> =0,023 p <sub>2</sub> =0,001 p <sub>3</sub> =0,005
Аргинин	0,39±0,02 [0,35-0,43]	0,86±0,09 [0,68-1,04]	0,47±0,04 [0,39-0,55]	0,31±0,02 [0,27-0,35]	0,47±0,06 [0,35-0,59]	0,29±0,03 [0,23-0,35]	p <sub>1</sub> =0,014 p <sub>2</sub> =0,002 p <sub>3</sub> =0,002

транспорта аминокислот, изменением катаболизма и анаболизма белков [2] важное значение может иметь модификация активности ферментов. Повышение активности АСТ сопровождается увеличением количества аспарагиновой кислоты при ПН. Снижение активности ГДГ, катализирующей окислительное дезаминирование глутаминовой кислоты, является основной причиной избыточного накопления глутаминовой кислоты в плаценте в разные периоды беременности. Еще одной реакцией, в результате изменения которой может увеличиваться количество глутаминовой кислоты, является повышение

в среднем на 20%. Снижение содержания в пределах 18–22% установлено для остальных измеренных аминокислот, причем наибольшее отклонение характерно для цистеина, наименьшая – для аланина. В 16–20 недель направленность изменений сохраняется, но они значительно выше, чем в I триместре беременности. Так, содержание глутаминовой и аспарагиновой кислот возрастает на 36,7% и 41,3%, соответственно, уменьшение уровня остальных аминокислот варьирует от 31,7% (для тирозина) до 44,5% (для аргинина). В конце беременности (39–40 нед) при ПН степень изменения аминокислотного состава в плаценте занимает промежуточное положение между I и II триместрами. Концентрация глутаминовой кислоты повышена на 25,6%, а аспарагиновой – на 32,2%, размах степени снижения уровня остальных аминокислот – от 25,4% до 36,1%.

Взаимозависимость между показателями активности ферментов и содержанием свободных аминокислот при ПН подтверждают результаты корреляционного анализа. Позитивная корреляционная зависимость выявлена между активностью АСТ и содержанием аспарагиновой кислоты ( $r=0,79; 0,85; 0,82$ , соответственно в I, II и III триместрах гестации, во всех случаях  $p<0,01$ ). Негативная корреляционная зависимость я во все сроки беременности установлена для глутаминовой кислоты и активности ГДГ ( $r=-0,80; -0,86; -0,83$ , во всех случаях  $p<0,01$ ). Между содержанием глутаминина и активностью глутаминазы также обнаружена негативная зависимость:  $r=-0,82$  ( $p<0,01$ );  $-0,85$  ( $p<0,01$ );  $-0,84$  ( $p<0,01$ ) в I, II и III триместрах соответственно. Для остальных аминокислот на протяжении осложненной беременности имеет место прямая корреляция с активностью соответствующих ферментов их обмена. Причем степень ее достаточно высока: коэффициенты корреляции находятся в пределах 0,79–0,87, достоверность корреляционной связи  $p<0,01$ .

**Обсуждение.** Среди причин, которые способны вызвать дисбаланс в метаболизме аминокислот в плаценте при осложненной беременности, наряду с нарушением

активности глутаминазы (ФАГ), параллельно с уменьшением содержания глутаминина. Помимо этого фермента в регуляции содержания глутаминина принимают участие реакции, связанные с синтезом и реакцией трансаминирования. Для обоих ферментов: ГС и ГКТ установлено снижение активности, что дополняет возможность уменьшения количества глутаминина в плаценте при ПН, наряду с вышеуказанным увеличением интенсивности его дезаминирования при действии глутаминазы (ФАГ).

Изменение содержания дикарбоновой глутаминовой кислоты, ее амида и второй дикарбоновой аминокислоты – аспарагиновой, которые участвуют в синтезе иных аминокислот, нуклеиновых кислот, биоактивных соединений, в регуляции ферментативных реакций. Эти реакции сопряжены с циклом трикарбоновых кислот и, несомненно, оказывают воздействие на функциональную активность фетоплацентарного комплекса при ПН. Роль нарушения метаболизма глутаминовой кислоты повышается также в связи с ее влиянием на процессы дыхания в митохондриях, четвертую часть которых от общего уровня обеспечивает именно эта аминокислота [7].

При ПН в течение всех триместров беременности снижается активность АЛТ. Этот фермент осуществляет трансаминирование аланина; последний задействован во многих метаболических процессах [8]. Кроме того, он занимает третье место среди всех аминокислот по содержанию в плаценте, не считая глутаминина. Это усиливает значимость уменьшения его содержания в развитии негативных метаболических последствий. Тесная корреляционная связь между уровнем аланина и активностью АЛТ подтверждает и их взаимозависимость. Аналогичное по степени снижение активности Тир-Т приводит к уменьшению количества тирозина, обладающего антиоксидантными свойствами, что сопровождается нарушениями окислительно-восстановительных процессов. Изменение содержания тирозина также может приводить к снижению продукции важных гормональных производных этой

аминокислоты, необходимых для полноценного развития плода. Опосредованное влияние на многие метаболические процессы в плаценте при ПН оказывает уменьшение активности Цис-Т и коррелирующее с ним снижение уровня цистеина. Важным путем влияния изменения этих параметров является понижение продукции таурина, в которой участвует цистеин. Эта аминокислота не входит в состав белков, но влияет на различные метаболические функции клеток: регулирует антиоксидантные реакции, обладает мембрано-протекторными свойствами, усиливает анаболические процессы [9,10]. Негативное воздействие снижения уровня цистеина в плаценте усугубляется изменением количества глутатиона, в синтезе которого также участвует цистеин.

Еще одним ферментом с важными регуляторными функциями, является аргиназа. Снижение ее активности является основной причиной уменьшения содержания аргинина, частично заменимой аминокислоты и, в определенной мере, незаменимой для плода, особенно в условиях осложненной беременности [11]. Аргинин является субстратом при синтезе вазодилататора – оксида азота; нарушение его синтеза может нарушать гемодинамику в плаценте и приводить к ухудшению фетоплацентарного кровотока. В настоящее время получены данные о регуляции аргинином экспрессии генов, ответственных за синтез ферментов, которые влияют на соотношение про- и антиоксидантных процессов в биологической реакции воспаления [12]. Очевидно, что аргинин разными путями может изменять соотношение окислительно-восстановительных реакций, и уменьшение его концентрации способно усиливать внутриутробную гипоксию при ПН.

Наиболее выраженную модификацию метаболизма аминокислот во II триместре беременности, по сравнению с другими триместрами, мы наблюдали не только при ПН, но и при физиологической беременности, когда отмечена значительная лабильность количественных показателей. Это, очевидно, связано с наиболее интенсивным ростом и развитием плода, а также активными морфофункциональными изменениями в плаценте, которые необходимы для обеспечения повышенных потребностей плода. Сопоставление показателей свободных аминокислот в плаценте при ПН с ранее полученными результатами в сыворотке крови матери и крови плода [5] позволило установить, что по степени и направленности изменения содержания аминокислот плацентарная ткань более близка к крови плода. Это подтверждает ведущую роль плаценты в формировании аминокислотного состава плода по сравнению с ролью материнского организма.

Подытоживая причины дисбаланса аминокислотного состава плаценты при ПН, можно еще раз отметить особенно важную роль в этом дисбалансе изменения активности ферментов. Что касается самих ферментов, то модификация их активности прежде всего связана с нарушением разных уровней структуры апофермента и количества коферментов, что можно наблюдать при ПН [13].

**Заключение.** Развитие ПН происходит на фоне нарушения активности ферментов метаболизма аминокислот и количественного состава аминокислот в плаценте, которые служат субстратами (продуктами) оцененным нами ферментативных реакций. Выявленные изменения сопровождаются нарушениями разных сторон плацентарного метаболизма: азотистого, энергетического, углеводного, усиливают прооксидантные процессы и, как следствие, развитие

внутриутробной гипоксии, а также снижение фетоплацентарного кровотока. Все эти отклонения, очевидно, приводят к дисфункции плаценты, которая характеризуется метаболическими, структурными, функциональными изменениями в плацентарной ткани и фетоплацентарной системе в целом, что отражается на процессах роста и развития плода.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской помощи.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4,7-12 см. REFERENCES)

5. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Михельсон А.А., Михельсон А.Ф., Лебедеко Е.Ю. и др. Влияние дисбаланса аминокислот в организме матери и плода на формирование недостаточности плаценты и течение неонатального периода. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(10): 610-4.
6. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Линде В.А. Дисбаланс системы глутамин-глутаминовая кислота в плаценте и околоплодных водах при плацентарной недостаточности. *Биомедицинская химия*. 2014; 60(5): 596-601.
13. Погорелова Т.Н., Гунько В.О., Никашина А.А., Аллилуев И.А., Боташева Т.Н. Посттрансляционная модификация и дифференциальная экспрессия белков при плацентарной недостаточности. *Проблемы репродукции*. 2016; 6: 115-9.

#### REFERENCES

1. Bröer S., Bröer A. Amino acid homeostasis and signaling in mammalian cells and organisms. *Biochem. J.* 2017; 474(12): 1935-63.
2. Wu G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids*. 2013; 45(3):407-11.
3. Jansson T., Powell T.L. Role of placental nutrient sensing in developmental programming. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2013; 56(3): 591-601.
4. Barker D.J., Thornburg K.L. Placental programming of chronic diseases, cancer and lifespan: a review. *Placenta*. 2013; 34(10): 841-5.
5. Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Mikhelson A.A., Mikhelson A.F., Lebedenko E.Yu. et al. Influence of amino acid imbalance in maternal and fetal organisms on the development of placental insufficiency and the course of the neonatal period. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63 (10): 610-4. (in Russian)
6. Pogorelova T.N., Gunko V.O., Linde V.A. Imbalance of system of glutamin – glutamic acid in the placenta and amniotic fluid at placental insufficiency. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2014; 60(5): 596-601. (in Russian)
7. Wu X., Xie C., Zhang Y., Fan Z., Yin Y., Blachier F. Glutamate-glutamine cycle and exchange in the placenta-fetus unit during late pregnancy. *Amino Acids*. 2015; 47(1): 45-53.
8. D'Mello J.P.F., ed. Amino acids in human nutrition and health. Wallingford; CAB International; 2012.
9. Lambert I.H., Kristensen D.M., Holm J.B., Mortensen O.H. Physiological role of taurine from organism to organelle. *Acta Physiol. (Oxf.)* 2015; 213(1): 191-212.
10. Desforges M., Parsons L., Westwood M., Sibley C.P., Greenwood S.L. Taurine transport in human placental trophoblast is important for regulation of cell differentiation and survival. *Cell Death Dis.* 2013; 4: e559.
11. Khalil A., Hardman L., O'Brien P. The role of arginine, homoarginine and nitric oxide in pregnancy. *Amino Acids*. 2015; 47(9): 1715-27.
12. Lei X., Feng C., Liu C., Wu G., Meiningner C.J., Wang F. et al. Regulation of protein expression by L-arginine in endothelial cells. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*. 2011; 3: 655-61.
13. Pogorelova T.N., Gunko V.O., Nikashina A.A., Alliluev I.A., Botashева T.L. Post-translational modifications and differential expression of proteins in placental insufficiency. *Problemy reproduktivnoy*. 2016; 6: 115-9. (in Russian)

Поступила 30.03.19

Принята к печати 04.04.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Бельская Л.В.<sup>1</sup>, Косенок В.К.<sup>2</sup>, Постнова Т.В.<sup>2</sup>

## ПРОЦЕССЫ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ В СЛЮНЕ ПРИ ЦЕНТРАЛЬНОМ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

<sup>1</sup>Омский государственный педагогический университет, 644043, Омск;

<sup>2</sup>Омский государственный медицинский университет, 644099, Омск

*Цель исследования - установить закономерности изменения параметров эндогенной интоксикации и липопероксидации в слюне пациентов с раком легкого в зависимости от формы роста опухоли (центральный, периферический или медиастинальный рак). В исследовании случай – контроль приняли участие 562 добровольца, которые были разделены на 2 группы: основную (рак легкого, n=347) и контрольную (условно здоровые, n=215). Всем участникам было проведено анкетирование, биохимическое исследование слюны, гистологическая верификация диагноза. Показано, что при периферическом раке легкого наблюдается статистически достоверное повышение концентрации альбумина ( $p < 0,0001$ ), при центральном – малонового диальдегида ( $p = 0,0330$ ). Содержание вторичных продуктов липопероксидации по сравнению с контролем повышено для всех групп ( $p < 0,0001$ ), однако различия наиболее выражены для медиастинальной формы роста. Уровень среднемолекулярных токсинов и для центрального, и для периферического рака легких статистически достоверно превышает соответствующее значение для контрольной группы ( $p = 0,0002$ ). Таким образом, при периферической форме роста рака легкого в условиях гипоксии процессы липопероксидации выражены в меньшей степени, тогда как процессы эндотоксикоза одинаковы как при центральном, так и при периферическом раке. Для медиастинальной формы роста процесс липопероксидации направлен в сторону образования токсичных оснований Шиффа, а низкий уровень среднемолекулярных токсинов свидетельствует о большей устойчивости белков к окислительному стрессу.*

**Ключевые слова:** слюна, среднемолекулярные токсины, перекисное окисление липидов, рак легкого, гистологический тип, форма роста.

**Для цитирования:** Бельская Л.В., Косенок В.К., Постнова Т.В. Процессы липопероксидации и эндогенной интоксикации в слюне при центральном и периферическом раке легкого. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5): 265-270

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-265-270>

Bel'skaya L.V.<sup>1</sup>, Kosenok V.K.<sup>2</sup>, Postnova T.V.<sup>2</sup>

### THE PROCESSES OF LIPOPEROXIDATION AND ENDOGENOUS INTOXICATION IN SALIVA IN CENTRAL AND PERIPHERAL LUNG CANCER

<sup>1</sup>Omsk State Pedagogical University, Omsk, 644043, Russian Federation;

<sup>2</sup>Omsk State Medical University, Omsk, 644099, Russian Federation

*The aim of the study was to establish the patterns of changes in the parameters of endogenous intoxication and lipoperoxidation processes in the saliva of patients with lung cancer, depending on the form of tumor growth (central, peripheral or mediastinal cancer). Materials and methods: in the case - control study was attended by 562 volunteers, who were divided into 2 groups: main (lung cancer, n = 347) and control group (relatively healthy, n = 2015). Questioning, biochemical saliva study and histological verification of the diagnosis carried out to all participants. In peripheral lung cancer, there is a statistically significant increase in the albumin concentration ( $p < 0.0001$ ), with a central MDA ( $p = 0.0330$ ). The content of secondary lipoperoxidation products compared with the control is increased for all groups ( $p < 0.0001$ ), however, the differences are most pronounced for the mediastinal growth form. The level of medium molecular toxins is the same for both central and peripheral lung cancer, and the distribution coefficient has a stable value exceeding the corresponding value for the control group ( $p = 0.0002$ ). Thus, in the peripheral form of lung cancer growth under hypoxic conditions lipoperoxidation processes are less pronounced, while endotoxigenic processes are the same in both central and peripheral cancer. For the mediastinal growth, the process of lipoperoxidation is directed towards the formation of toxic Schiff bases, and the low level of medium-molecular toxins indicates a greater resistance of proteins to oxidative stress.*

**Key words:** saliva, medium-molecular toxins, lipid peroxidation, lung cancer, histological type, form of growth.

**For citation:** Bel'skaya L.V., Kosenok V.K., Postnova T.V. The processes of lipoperoxidation and endogenous intoxication in saliva in central and peripheral lung cancer. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (5): 265-270 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-265-270>

**For correspondence:** Bel'skaya L.V., PhD in Chemistry, Associate Professor; e-mail: [ludab2005@mail.ru](mailto:ludab2005@mail.ru)

#### Information about authors:

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

Kosenok V.K., <http://orcid.org/0000-0002-2072-2460>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 01.04.2019  
Accepted 15.04.2019

В настоящее время рак легкого занимает лидирующие позиции в структуре онкологических заболеваний [1–2]. В связи с чем остаются актуальными проблемы оптимизации методов его диагностики [3]. Рак легкого объединяет группу опухолей, различающихся по течению, морфологическому строению и прогнозу [4]. При этом важно учитывать не только гистологический тип опухоли, но и форму роста опухоли (центральный, периферический или медиастинальный рак), характер ее взаимоотношения с окружающими структурами, в частности особенности лимфодинамики различных регионарных зон [5]. Известны клинические различия между центральным и периферическим раком легкого [4–6], однако детального исследования особенностей биохимического состава биологических жидкостей с одновременным учетом формы роста и гистологического типа опухоли до настоящего времени не проводилось.

Цель исследования – установление закономерностей изменений параметров эндогенной интоксикации и липопероксидации в слюне пациентов с раком легкого в зависимости от формы роста опухоли (центральный, периферический или медиастинальный рак).

**Материал и методы.** В исследование включены 347 пациентов Клинического онкологического диспансера г. Омска больных раком легкого с различными гистологическими типами (плоскоклеточный рак – 116, аденокарцинома – 174, нейроэндокринные опухоли – 57 человек) и формой роста (центральный – 111, периферический – 220, медиастинальный рак – 16 человек). Контрольная группа включала 215 условно здоровых пациентов, у которых при проведении плановой диспансеризации не было выявлено патологии легких. Средний возраст больных составил  $58,9 \pm 1,1$  года для основной и  $57,4 \pm 1,5$  года для контрольной группы. Включение в группы происходило параллельно. В качестве критериев включения

рассматривались: возраст пациентов 30–75 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта. Критерии исключения: отсутствие гистологической верификации диагноза. Исследование одобрено на заседании комитета по этике БУЗ Омской области «Клинический онкологический диспансер» от 21 июля 2016 г., протокол № 15.

У всех участников до начала лечения проводили забор слюны в количестве 2 мл. Во всех образцах определяли содержание субстратов для процессов липопероксидации (диеновых конъюгатов, триеновых конъюгатов, оснований Шиффа, малонового диальдегида – МДА), альбумина, уровень среднемолекулярных токсинов (МСМ) [7, 8].

Статистический анализ выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft, США) и пакета R (версия 3.2.3) непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах – U-критерия Манна-Уитни. Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Установлено, что на фоне рака легких независимо от гистологического типа опухоли происходит уменьшение уровня МСМ (табл. 1), причем выявленная закономерность характерна как для ароматических (280 нм), так и для неароматических хромофоров (254 нм). Одновременно наблюдается рост статистически достоверный рост коэффициента распределения МСМ 280/254 нм (см. табл. 1).

Показано, что при раке легкого уменьшается содер-

Таблица 1

Показатели липопероксидации и эндогенной интоксикации в зависимости от гистологического типа рака легких

Параметры	Контроль, n=215	АК, n=174	ПРЛ, n=116	НЭО, n=57
Альбумин, ммоль/л	0,298 [0,199; 0,484]	0,337 [0,183; 0,535]	0,315 [0,178; 0,495]	0,297 [0,172; 0,398]
Диеновые конъюгаты, у.е.	3,90 [3,79; 4,07]	3,87 [2,99; 4,10]	3,81 [2,82; 4,05]	3,88 [2,85; 4,15]
	-	$p_i=0,0036$	$p_i=0,0001$	-
Триеновые конъюгаты, у.е.	0,894 [0,828; 0,973]	0,946 [0,836; 1,188]	0,985 [0,827; 1,231]	0,961 [0,797; 1,275]
	-	$p_i=0,0003$	$p_i<0,0001$	$p_i=0,0366$
Основания Шиффа, у.е.	0,543 [0,508; 0,575]	0,556 [0,503; 0,671]	0,579 [0,513; 0,681]	0,563 [0,503; 0,676]
	-	$p_i=0,0420$	$p_i=0,0005$	-
МДА, мкмоль/л	6,75 [5,90; 8,38]	7,18 [5,81; 9,32]	7,52 [5,64; 9,49]	6,92 [5,77; 9,40]
МСМ 254, у.е.	0,287 [0,200; 0,407]	0,267 [0,185; 0,400]	0,244 [0,155; 0,379]	0,255 [0,155; 0,451]
	-	-	$p_i=0,0052$	-
МСМ 280, у.е.	0,248 [0,176; 0,356]	0,242 [0,168; 0,365]	0,216 [0,149; 0,333]	0,200 [0,128; 0,334]
	-	-	$p_i=0,0460$	-
МСМ 280/254	0,852 [0,773; 0,957]	0,913 [0,817; 1,002]	0,907 [0,804; 1,058]	0,899 [0,790; 0,989]
	-	$p_i=0,0012$	$p_i=0,0009$	-

Примечание.  $p_i$  – статистически достоверные различия с контрольной группой.

Показатели липопероксидации и эндогенной интоксикации в зависимости от формы роста рака легких

Параметры	Центральный, n=111	Периферический, n=220	Медиастинальный, n=16
Альбумин, ммоль/л	0,304 [0,158; 0,429]	0,337 [0,192; 0,529]	0,255 [0,159; 0,398]
Диеновые конъюгаты, у.е.	3,80 [2,71; 4,02] $p_i=0,0010$	3,86 [2,96; 4,09]	3,82 [2,31; 4,15]
Триеновые конъюгаты, у.е.	0,984 [0,833; 1,257] $p_i<0,0001$	0,938 [0,825; 1,186] $p_i<0,0001$	0,987 [0,797; 1,222] $p_i<0,0001$
Основания Шиффа, у.е.	0,572 [0,524; 0,683] $p_i<0,0001$	0,559 [0,498; 0,671] $p_i<0,0001$	0,586 [0,532; 0,669] $p_i<0,0001$
МДА, мкмоль/л	7,52 [5,90; 9,49] $p_i=0,0330$	6,97 [5,64; 9,32]	6,58 [5,47; 9,66]
МСМ 254, у.е.	0,261 [0,171; 0,418]	0,258 [0,164; 0,396] $p_i=0,0492$	0,189 [0,140; 0,320] $p_i=0,0038$
МСМ 280, у.е.	0,235 [0,161; 0,362]	0,231 [0,150; 0,351]	0,224 [0,115; 0,333]
МСМ 280/254	0,908 [0,820; 1,041] $p_i=0,0002$	0,907 [0,800; 0,996] $p_i=0,0003$	0,909 [0,831; 1,137] $p_i=0,0021$

Примечание.  $p_i$  – статистически достоверные различия с контрольной группой.

жение первичных продуктов перекисного окисления липидов, тогда как уровень триеновых конъюгатов и оснований Шиффа растет. Расчет коэффициента корреляции по Спирмену показал, что существует отрицательная корреляционная связь между уровнем диеновых и триеновых конъюгатов ( $r=-0,3665$ ,  $r=-0,5532$  и  $r=-0,7987$ ) и положительная корреляционная связь между содержанием триеновых конъюгатов и оснований Шиффа ( $r=0,7283$ ,  $r=0,7555$  и  $r=0,7717$  для аденокарциномы, плоскоклеточного и нейроэндокринного рака соответственно). Содержание конечного продукта липопероксидации МДА выше при раке легких, однако статистически достоверного увеличения данного показателя выявить не удалось. Дополнительно отмечено увеличение концентрации альбумина при немелкоклеточном раке легких (+13,1% для аденокарциномы, +5,7% для плоскоклеточного рака легких), тогда как для нейроэндокринных опухолей уровень альбумина не превышает значений, характерных для контрольной группы (см. табл. 1).

На следующем этапе исследования проведено сравнение показателей липопероксидации и эндогенной интоксикации в зависимости от формы роста опухоли (табл.2). Показано, что статистически достоверное повышение концентрации альбумина наблюдается при периферической (+13,1%), а МДА – при центральной форме роста (+11,4%). Уровень МСМ одинаков и для центрального, и для периферического рака легких, при этом коэффициент распределения МСМ 280/254 нм имеет стабильное значение, превышающее соответствующее значение для контрольной группы (+6,6%). Содержание вторичных продуктов липопероксидации по сравнению с контролем повышено для всех групп ( $p_i<0,0001$ ), однако различия наиболее выражены для медиастинальной формы роста (см. табл. 2).

Отдельно стоит остановиться на рассмотрении исследуемых показателей при медиастинальной форме роста, которая наблюдается преимущественно для нейроэндокринных опухолей. Отмечен более низкий уровень фракции МСМ 254 нм, однако коэффициент рас-

пределения МСМ 280/254 нм не отличается от значений, характерных для центрального и периферического рака легких. При этом уровень вторичных продуктов липопероксидации для медиастинальной формы роста выше, в частности наблюдается максимальный уровень токсичных оснований Шиффа, что позволяет говорить о более выраженных явлениях липопероксидации, чем в случае других форм роста, а также других гистологических типов рака легкого. Низкий уровень альбумина в данном случае может быть обусловлен нарушениями процессов детоксикации.

При одновременном учете гистологического типа и формы роста опухоли выявлены особенности динамики показателей липопероксидации и эндогенной интоксикации (табл.3). Так, при периферической форме роста уровень обеих фракций МСМ выше для немелкоклеточного рака (+11,4 и +5,5% для аденокарциномы, +11,8 и +2,8% для плоскоклеточного рака), для нейроэндокринных опухолей наблюдается обратная тенденция (-44,2 и -38,0% для фракции 254 и 280 нм соответственно). Повышение уровня МСМ может быть связано со снижением транспорта кислорода, более ярко выраженное для периферического рака легких, а также с нарушением элиминации токсинов. Несмотря на разнонаправленное изменение фракционного состава МСМ, коэффициент распределения МСМ 280/254 нм выше для центральной формы роста для всех гистологических типов рака легкого (табл. 2).

Уровень продуктов липопероксидации при переходе от центральной формы роста к периферической меняется неравномерно в зависимости от гистологического типа опухоли. Так, содержание диеновых конъюгатов растет для аденокарциномы (+3,2%) и плоскоклеточного рака (+3,5%), но уменьшается для нейроэндокринных опухолей (-5,6%). Содержание триеновых конъюгатов напротив снижается в случае периферического немелкоклеточного рака легких (-2,4% и -13,1% для аденокарциномы и плоскоклеточного рака соответственно), однако статистически достоверно растет при нейроэндокринном раке (+12,5%). Динамика

**Показатели липопероксидации и эндогенной интоксикации в зависимости от формы роста и гистологического типа (ГТ) рака легких**

Параметр	ГТ	Центральный	Периферический	P-value
Альбумин, ммоль/л	АК	0,264 [0,158; 0,376]	0,358 [0,187; 0,554]	$p_1=0,0267$
	ПРЛ	0,305 [0,158; 0,510]	0,344 [0,198; 0,485]	-
	НЭО	0,340 [0,206; 0,416]	0,257 [0,172; 0,347]	-
Диеновые конъюгаты, у.е.	АК	3,79 [2,71; 4,00]	3,91 [3,16; 4,11]	-
	ПРЛ	3,73 [2,67; 3,92]	3,86 [3,41; 4,09]	$p_1=0,0450$
	НЭО	3,93 [2,89; 4,20]	3,71 [2,85; 4,05]	-
Триеновые конъюгаты, у.е.	АК	0,963 [0,850; 1,133]	0,940 [0,831; 1,190]	-
	ПРЛ	1,073 [0,849; 1,351]	0,932 [0,816; 1,142]	$p_1=0,0321$
	НЭО	0,889 [0,773; 1,182]	1,000 [0,802; 1,504]	$p_1=0,0478$
Основания Шиффа, у.е.	АК	0,554 [0,511; 0,676]	0,557 [0,498; 0,671]	-
	ПРЛ	0,614 [0,540; 0,760]	0,555 [0,499; 0,638]	$p_1=0,0107$
	НЭО	0,550 [0,503; 0,636]	0,563 [0,488; 0,789]	-
МДА, мкмоль/л	АК	8,46 [6,24; 9,49]	6,92 [5,81; 9,32]	-
	ПРЛ	7,18 [5,64; 9,49]	7,52 [5,56; 9,57]	-
	НЭО	7,26 [6,15; 8,72]	6,88 [5,38; 9,23]	-
МСМ 254, у.е.	АК	0,246 [0,190; 0,389]	0,274 [0,185; 0,409]	-
	ПРЛ	0,228 [0,154; 0,385]	0,255 [0,164; 0,390]	-
	НЭО	0,394 [0,198; 0,491]	0,220 [0,155; 0,347]	-
МСМ 280, у.е.	АК	0,238 [0,192; 0,326]	0,251 [0,168; 0,370]	-
	ПРЛ	0,211 [0,145; 0,308]	0,217 [0,162; 0,341]	-
	НЭО	0,316 [0,136; 0,455]	0,196 [0,128; 0,275]	-
МСМ 280/254	АК	0,925 [0,821; 1,007]	0,908 [0,815; 0,997]	-
	ПРЛ	0,922 [0,831; 1,053]	0,896 [0,800; 1,033]	-
	НЭО	0,899 [0,800; 0,989]	0,861 [0,723; 0,962]	-

Примечание.  $p_1$  – статистически достоверные различия с контрольной группой.

уровня оснований Шиффа и концентрации МДА находится в противофазе: рост одного показателя при переходе от центрального рака к периферическому сопровождается уменьшением другого (табл. 3). Отличительной особенностью является уменьшение уровня оснований Шиффа при плоскоклеточном раке легкого. Тогда как концентрация альбумина повторяет описанные выше закономерности для МСМ. Данный факт подтверждается наличием положительной корреляции между концентрацией альбумина и уровнем МСМ ( $r=0,4321$  и  $r=0,4034$  для фракции 254 и 280 нм соответственно).

**Обсуждение.** В последние годы широко обсуждается патогенетическая роль свободных радикалов кислорода и инициируемых ими процессов липопероксидации в развитии заболеваний, в том числе онкологических [9]. В частности, в легких окислительный стресс индуцирует модификацию белков, активацию макрофагов и рекрутирование нейтрофилов в центральных и периферических воздухоносных путях, аккумуляцию токсичных продуктов липопероксидации, пероксида водорода, нитрозотиолов и нитратов в мембранах легких и крови, а также в выдыхаемом воздухе [10, 11]. Кроме того, окислительный стресс может провоцировать гиперплазию слизистых оболочек желез и апоптоз эпителиальных клеток бронхов [12]. Комплексные метаболические нарушения и неспецифические клинические проявления, которые сопровождают развитие злокачественного новообразования, характеризуются как синдром эндогенной интоксикации [13].

Изучению показателей эндогенной интоксикации и липопероксидации в слюне посвящен ряд работ, при этом подавляющее большинство исследований ограничиваются оценкой содержания МДА [14, 15]. Однако, несмотря на многочисленные литературные данные, демонстрирующие возрастание уровня МДА в слюне при злокачественных новообразованиях [14, 15], нами было показано, что характер изменения концентрации МДА при раке легкого нелинейно связан с опухолевой прогрессией [16]. В связи с чем для комплексной оценки уровня эндогенной интоксикации и процессов липопероксидации определение МДА является мало информативным [16, 17].

Тем не менее, установлено, что на фоне рака легкого независимо от гистологического типа наблюдается уменьшение содержания первичных продуктов липопероксидации при одновременном росте содержания вторичных и уменьшении уровня МСМ. Исходя из предположения, что первичным продуктом образования МСМ являются ацилгидроперекиси и фрагменты поврежденных клеточных мембран, то наблюдается смещение равновесия в сторону накопления продуктов липопероксидации, а процессы эндогенного протеолиза на фоне рака легких замедляются.

Известно, что активные формы кислорода и продукты их реакций с другими биомолекулами, в частности липоперекиси, влияют на конформацию альбумина, а следовательно, на его связывающие свойства [18, 19]. Повышение концентрации альбумина может быть связано с

изменением объема транспорта различных метаболитов и, в первую очередь, жирных кислот, что является важным звеном перестройки энергетического метаболизма при росте злокачественной опухоли [13].

Выявленные различия между формами роста рака легкого связаны с тем, что по-видимому, при центральной форме роста выше доля активных форм кислорода, в связи с чем равновесие в процессах липопероксидации сдвинуто в сторону конечного продукта МДА. Для периферического рака легких наоборот, уровень диеновых конъюгатов максимальный, что может являться результатом гипоксии. При этом в большей степени накапливаются продукты протеолиза, что вызывает повышение концентрации альбумина. Молекулы альбумина способны связываться с эндогенными токсинами в комплексные ассоциаты, в виде которых происходит элиминация к органам детоксикации [13, 18]. Вероятно, повышение концентрации альбумина приводит к тому, что уровень МСМ во всех группах больных раком легкого ниже, чем в контрольной группе, а различия данного показателя для периферической формы роста статистически достоверны ( $p=0,0492$ ). Для медиастинальной формы роста отмечен более низкий уровень фракции МСМ 254 нм, что с учетом менее выраженной степени окислительного повреждения белков может быть обусловлено более высокой резистентностью опухолевых клеток к окислительному стрессу [16].

Известно, что клетки плоскоклеточного рака легкого при периферической форме роста проявляют большую пролиферативную активность, тогда как при центральной усиливается межклеточная адгезия [20]. В целом, у пациентов с аденокарциномой процент делящихся клеток значительно ниже, чем у пациентов с плоскоклеточным раком легкого [21, 22]. Уменьшение уровня оснований Шиффа и возрастание концентрации МДА в случае периферического плоскоклеточного рака свидетельствует о более высокой агрессивности опухоли и может являться неблагоприятным прогностическим фактором [23]. Более активный прирост фракции МСМ 254 нм при периферическом раке легкого вызван стимулирующей процессом липопероксидации и иммуногенеза, в связи с чем прирост концентрации альбумина, обладающего детоксицирующими свойствами вполне обоснован. Обратная ситуация на фоне нейроэндокринного рака обусловлена различным механизмом адаптации опухолевых клеток к условиям гипоксии при периферической форме роста. Для нейроэндокринных опухолей характерно уменьшение уровня первичных продуктов липопероксидации при увеличении доли вторичных, однако концентрации МДА снижается. Низкий уровень МСМ также подтверждает, что периферические формы характеризуются преобладанием процессов липопероксидации над протеолизом, как следствие, наблюдается низкая концентрация альбумина. При центральном нейроэндокринном раке преобладают первичные и конечные продукты липопероксидации, а уровень МСМ максимален по сравнению со всеми включенными в исследование группами, концентрация альбумина также повышена. Данный факт может свидетельствовать о наибольшей агрессивности и быстром росте центрального нейроэндокринного рака по сравнению с периферическим.

**Заключение.** Установлено, что при периферической форме роста рака легкого в условиях гипоксии процессы липопероксидации выражены в меньшей степени, тогда как процессы эндотоксикоза одинаковы как при централь-

ном, так и при периферическом раке. Для медиастинальной формы роста процесс липопероксидации направлены в сторону образования токсичных оснований Шиффа, а низкий уровень МСМ свидетельствует о большей устойчивости белков к окислительному стрессу. Учет гистологического типа опухоли позволяет выявить различия между центральной и периферической формами роста немелкоклеточного рака легкого и нейроэндокринных опухолей. Полученные результаты позволяют сделать вывод о необходимости учета формы роста опухоли при коррекции явлений эндотоксикоза у больных раком легкого различных гистологических типов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп.1, 3–5, 9, 11–12, 14–15, 17, 19, 22 см. REFERENCES)

- Петрова Г.В., Каприн А.Д., Грецова О.П., Старинский В.В. Злокачественные новообразования в России. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена; 2015: 259–82.
- Соболева Ю.В. Сравнительный анализ взаимодействия процессов пролиферации, апоптоза и межклеточной адгезии при центральном и периферическом плоскоклеточном раке легкого. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2009; 1: 61–2.
- Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов в гептан-изопропанольных экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии*. 1989; 1: 127–31.
- Гаврилов В.Б., Бидула М.М., Фурманчук Д.А., Конев С.В., Алейникова О.В. Оценка интоксикации организма по нарушению баланса между накоплением и связыванием токсинов в плазме. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1999; 2: 13–7.
- Макарова Е.В., Вахламов В.А., Шония М.Л., Меньков Н.В., Соловьева Т.И., Архипова Е.В., Варварина Г.Н., Новиков В.В. Выявление предикторов развития воспалительного процесса в бронхах начинающих курильщиков. *Современные технологии в медицине*. 2015; 7(3): 77–83.
- Смолякова Р.М., Прохорова В.И., Жарков В.В., Лаппо С.В. Оценка связывающей способности и транспортной функции сывороточного альбумина у больных раком легкого. *Новости хирургии*. 2005; 13(1–4): 78–84.
- Бельская Л.В., Косенок В.К., Массард Ж., Завьялов А.А. Состояние показателей липопероксидации и эндогенной интоксикации у больных раком легкого. *Вестник РАМН*. 2016; 71(4): 313–22.
- Шейбак В.М. Транспортная функция сывороточного альбумина: цинк и жирные кислоты. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2015; 14(2): 16–22.
- Соболева Ю.В., Кожемяко О.В. Некоторые биологические различия центральной и периферической форм плоскоклеточного рака легкого. *Дальневосточный медицинский журнал*. 2008; 3: 47–48.
- Туманский В.А., Шевченко А.И., Колесник А.П., Евсеев А.В., Баранчук С.В. Показатели пролиферативной активности опухоли у больных ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого. *Патология*. 2010; 7(2): 81–4.
- Давыдов М.И., Полоцкий Б.Е., Жураев Э.Э., Богущ Т.А., Лактионов К.К., Ахмедов Б.Б., Аллахвердиев А.К. Особенности клинического течения и прогноза периферического рака легкого у женщин. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина*. 2011; 22(3): 47–54.

#### REFERENCES

- Siegel R., Ma J., Zou Zh., Jemal Ah. Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.* 2014; 64(1): 9–29.
- Petrova G.V., Kaprin A.D., Gretsova O.P., Starinskiy V.V. Malignant neoplasms in Russia [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii]. Moscow: MNI OI im. P.A. Gertsena; 2015: 259–82. (in Russian)

3. Detterbeck F.C., Lewis S.Z., Diekemper R., Addizzo-Harris D.J., Alberts W.M. Diagnosis and management of lung cancer. *Chest*. 2013; 143(5): 7–37.
4. Kanaji N., Sakai K., Ueda Y., Miyawaki H., Ishii T., Watanabe N., Kita N., Kadota K., Kadowaki N., Bandoh S. Peripheral-type small cell lung cancer is associated with better survival and higher frequency of interstitial lung disease. *Lung Cancer*. 2017; 108: 126–33.
5. Park H.S., Harder E.M., Mancini B.R., Decker R.H. Central versus Peripheral Tumor Location influence on survival, local control, and toxicity following stereotactic body radiotherapy for primary non-small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015; 10(5): 832–37.
6. Soboleva Yu.V. Comparative analysis of the interaction of proliferation, apoptosis and intercellular adhesion in central and peripheral squamous cell lung cancer. *Tichookeanskiy meditsinskiy journal*. 2009; 1: 61–2. (in Russian)
7. Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Yarovinskiy B.G. Comparison of different approaches to the determination of products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1989; 1: 127–31. (in Russian)
8. Gavrilo V.B., Bidula M.M., Furmanchuk D.A., Konev S.V., Aleynikova O.V. Assessment of organism intoxication due to imbalance between accumulation and binding of toxins in plasma. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1999; 2: 13–7. (in Russian)
9. Choudhari S.K., Chaudhary M., Gadbaill A.R., Sharma A., Tekade S. Oxidative and antioxidative mechanism in oral cancer and precancer: a review. *Oral Oncology*. 2014; 50(1): 10–8.
10. Makarova Ye.V., Vakhlamov V.A., Shoniya M.L., Men'kov N.V., Solov'yeva T.I., Arkhipova Ye.V., Varvarina G.N., Novikov V.V. Identifying the predictors of the development of the inflammatory process in the bronchi of beginner smokers. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine*. 2015; 7(3): 77–83 (in Russian)
11. Park H.S., Kim S.R., Lee Y.C. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*. 2009; 14(1): 27–38.
12. Lin J.L., Thomas P.S. Current perspectives of oxidative stress and its measurement in chronic obstructive pulmonary disease. *COPD*. 2010; 7(4): 291–306.
13. Smolyakova R.M., Prokhorova V.I., Zharkov V.V., Lappo S.V. Evaluation of binding ability and transport function of serum albumin in patients with lung cancer. *Novosti khirurgii*. 2005; 13(1–4): 78–84. (in Russian)
14. Shetty S.R., Babu S., Kumari S., Shetty P., Hugde S., Castelino R. Status of salivary lipid peroxidation in oral cancer and precancer. *Indian journal of medical and pediatric oncology*. 2014; 35: 156–8.
15. Hegde N., Kumari S.N., Hegde M.N., Chandra P.M., Nireeksha R. Lipid peroxidation and vitamin C level in saliva of oral precancerous patients – an In-vitro study. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2011; 2(2): 13–8.
16. Bel'skaya L.V., Kosenok V.K., Massard Z., Zav'yalov A.A. Status Indicators of Lipid Peroxidation and Endogenous Intoxication in Lung Cancer Patients. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2016; 71(4): 313–22. (in Russian)
17. Hultqvist M., Hegbrant J. Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E and/or malondialdehyde is markers of oxygen free radical production during hemodialysis. *Clinical Nephrology*. 1997; 47(1): 37–46.
18. Sheybak V.M. Transport function of serum albumin: zinc and fatty acids. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2015; 14(2): 16–22. (in Russian)
19. Oettl K., Stauber R.E. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br. J. Pharmacol.* 2007; 151(5): 580–90.
20. Soboleva Yu.V., Kozhemyako O.V. Some biological differences between the central and peripheral forms of squamous cell lung cancer. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal*. 2008; 3: 47–8. (in Russian)
21. Tumanskiy V.A., Shevchenko A.I., Kolesnik A.P., Yevseyev A.V., Baranchuk S.V. Indicators of proliferative tumor activity in patients with early stages of non-small cell lung cancer. *Patologiya*. 2010; 7(2): 81–4. (in Russian)
22. Pankiewicz W., Minarowski L., Niklinska W. Immunohistochemical markers of cancerogenesis in the lung. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2007; 45(2): 65–74.
23. Davydov M.I., Polotskiy B.Ye., Zhurayev E.E., Bogush T.A., Laktionov K.K., Akhmedov B.B., Allakhverdiyev A.K. Features of the clinical course and prognosis of peripheral lung cancer in women. *Vestnik Rossiyskogo onkologicheskogo tsentra im. N. N. Blokhina RAMN*. 2011; 22(3): 47–54. (in Russian)

Поступила 01.04.19

Принята к печати 15.04.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Духовская Н.Е.<sup>1</sup>, Вавилова Т.П.<sup>1</sup>, Горбачева С.Ю.<sup>2</sup>, Гремякова П.В.<sup>2</sup>, Островская И.Г.<sup>1</sup>

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИСОПРОЛОЛА И АТОРВАСТАТИНА В СЛЮНЕ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ, 127473, Москва, Россия;

<sup>2</sup>Лабораторный центр ООО «Экзактэ Лабс», 117246, Москва, Россия

*Разработана методика количественного определения бисопролола и аторвастатина в слюне на жидкостном хромато-масс-спектрометре с тройным квадруполом LCMS-8040 МОДКЛЕМ с ионизацией, разделением и детектированием образцов. Метод позволяет определять концентрацию в слюне фармпрепаратов бисопролола с точностью от 93,7 до 98,5% и аторвастатина от 95,6 до 98,3%.*

**Ключевые слова:** слюна; метод жидкостной хромато-масс-спектрометрии; бисопролол; аторвастатин.

**Для цитирования:** Духовская Н.Е., Вавилова Т.П., Горбачева С.Ю., Гремякова П.В., Островская И.Г. Применение метода жидкостной хромато-масс-спектрометрии для определения бисопролола и аторвастатина в слюне. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5): 271-276. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-271-276>

*Dukhovskaya N.E.<sup>1</sup>, Vavilova T.P.<sup>1</sup>, Gorbacheva S.Yu.<sup>2</sup>, Gremyakova P.V.<sup>2</sup>, Ostrovskaya I.G.<sup>1</sup>*

APPLICATION OF THE METHOD OF LIQUID CHROMATO-MASS SPECTROMETRY FOR DETERMINATION OF BISOPROLOL AND ATORVASTATIN

<sup>1</sup>Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, 127473, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Laboratory center «Exacte Labs», 117246, Moscow, Russia

*A technique has been developed for the quantitative determination of bisoprolol and atorvastatin in mixed saliva on a LCMS-8040 triple quadrupole liquid chromatographic mass spectrometer with ionization, separation and detection of samples, which allows determining the concentration in mixed saliva of bisoprolol with an accuracy of 93.7 to 98, 5% and atorvastatin from 95.6 to 98.3%.*

**Key words:** mixed saliva; method a liquid chromatography-mass spectrometry; bisoprolol; atorvastatin.

**For citation:** *Dukhovskaya N.E., Vavilova T. P., Gorbacheva S. Yu., Gremyakova P.V., Ostrovskaya I.G. Application of the method of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of bisoprolol and atorvastatin. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (5): 271-276 (in Russ.)*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-271-276>

**For correspondence:** *Dukhovskaya N.E.*, Ph.D. Sci. Med., Associate Professor at the Department propaedeutics of dental diseases; e-mail: [ndukhovskay@mail.ru](mailto:ndukhovskay@mail.ru)

### Information about authors:

Dukhovskaya N.E., <https://orcid.org/0000-0003-0533-7051>

Vavilova T.P., <https://orcid.org/0000-0002-4255-8825>

Gorbacheva S. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-3235-0374>

Ostrovskaya I.G., <https://orcid.org/0000-0001-6788-4945>

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

**Acknowledgment.** *The study had no sponsor support.*

Received 06.03.2019  
Accepted 20.03.2019

**Введение.** В клинической практике наличие циркулирующих в межклеточной среде и в кровотоке лекарственных препаратов и их метаболитов чаще определяют в образцах биологической среды, в сыворотке крови и в моче. Между тем в последние десятилетия исследователи стали проявлять интерес к слюне в качестве биоматериала [1, 2]. Важными преимуществами использования слюны в качестве образца являются атравматичность сбора, безопасность биологического материала и меньшая трудоемкость в исполнении метода [3]. Для отработки этого определения потребовалось унифицировать этапы пробоподготовки образцов слюны, осуществить калибровку

прибора, который обладает высокой чувствительностью, а также создания тест-панелей для определения концентрации интересующих аналитов в слюне [4].

По данным N.A.Desrosies и соавт. [5], в секрете слюнных желез содержится «свободное» лекарственное вещество, а препараты, которые прочно связываются с белками плазмы крови, обнаружить удается только в следовых количествах. В слюну лекарственные вещества попадают через транспортную систему слюнных желез, слизистую оболочку полости рта, вместе с жидкостью десен [3]. Препараты с липофильными свойствами клетки выделяют в слюну пассивно, что зависит от степени их диссоциации и pH [6]. Конкурируя за транспортные системы слюнных желез, лекарственные препараты могут влиять на формирование слюнных молекул, что может приводить к изменению объема выделяемого

**Для корреспонденции:** *Духовская Наталья Евгеньевна*, канд. мед. наук, доц. каф. пропедевтики стоматологических заболеваний; e-mail: [ndukhovskay@mail.ru](mailto:ndukhovskay@mail.ru)

секрета [7]. Заметим, что выделение лекарственных препаратов в слюну не является основным способом их экскреции из организма. Действие лекарственного препарата обычно заканчивается его метаболизмом в печени (гидролиз, окисление, конъюгация) и выведением с мочой, желчью или непосредственно через стенку кишечника [5]. В меньшей степени выделительную функцию берут на себя потовые, слезные и слюнные железы [8].

Анализ данных литературы показал, что в большинстве публикаций предпочтение авторы отдают выявлению в слюне наркотических веществ [1,5, 9-11], но мало внимания уделено другим лекарственным препаратам, которые стоят в стандартном списке назначений по медицинским показаниям. Для лечения артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, сердечной недостаточности, нарушения сердечного ритма клиницисты назначают  $\beta$ 1-адреноблокаторы, в частности, бисопролол (БС), который подвержен метаболизму в печени и далее выводится почками [12]. Для уменьшения образования атеросклеротических бляшек в кровеносных сосудах назначают препарат аторвастатин, который подавляет образование спирта холестерина путем ингибирования синтеза его ключевого фермента 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермента А-редуктазы. Метаболизм холестерина проходит в печени и выделение происходит с желчью [13]. В связи с этим, точный и чувствительный метод определения концентрации аторвастатина и БС в смешанной слюне может явиться перспективным в лабораторной диагностике, так как содержание препаратов можно использовать в медицине для контроля лекарственных средств, проведения токсико-химического анализа.

Цель исследования: применить метод жидкостной хромато-масс-спектрометрии для определения БС и аторвастатина в слюне.

**Материал и методы.** Для определения получены образцы смешанной слюны у 16 пациентов, которые находились на стационарном лечении в ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России. С целью коррекции основного заболевания, пациенты принимали лекарственные препараты: группа А - бисопролол ( $n=7$ ), группа В - аторвастатин ( $n=4$ ), группа С - бисопролол+аторвастатин ( $n=5$ ). Для сравнения оценены образцы слюны здоровых добровольцев ( $n=6$ ), которые не принимали лекарственные препараты.

Сбор слюны проводили путём сплевывания без стимуляции в стерильную пластиковую градуированную пробирку в течение 5 мин и до начала определения хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Перед исследованием пробы слюны размораживали при комнатной температуре в течение 1,5 часов и перемешивали до однородного состояния на механическом смесителе. Для выделения аналитов в слюне использовали метод осаждения белков с последующим упариванием супернатанта. Образцы слюны исследовали на жидкостном хромато-масс-спектрометре с тройным квадруполом LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония) с программным обеспечением LabSolutions 5.80. Анализ определяемых препаратов выполнен при ионизации в электроспрее при атмосферном давлении (ESI) в положительном режиме.

Индивидуальные растворы аналитов (аторвастатина и бисопролола) и раствор внутреннего стандартного образца (ВС) готовили взятием точной навески, соответствующей 10 мг аналита с учетом чистоты и растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (аторвастатин, ВС) и в

метаноле (бисопролол) до концентрации 1 мг/мл. Стандартные образцы хранились при температуре  $< -65^{\circ}\text{C}$ . Рабочие стандартные растворы аналитов готовили последовательным разбавлением исходных растворов в смеси ацетонитрил/вода (1/1). Калибровочные образцы и образцы контроля качества (КК) готовили путем добавления соответствующего раствора аналита к 100 или к 200 мкл интактной слюны для определения аторвастатина и бисопролола соответственно, непосредственно перед проведением всех процедур подготовки проб.

Интактную слюну готовили смешением слюны шести добровольцев, заведомо не содержащей определяемых аналитов.

**Метод определения аторвастатина.** Хроматографическое разделение аторвастатина проводили на хроматографической колонке Acquity UPLC ВЕН С18, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 $\times$ 50 mm в градиентном режиме элюирования при скорости потока 0,5 мл/мин. Температура колонки -  $40^{\circ}\text{C}$ . В качестве подвижных фаз использовали 0,1% муравьиную кислоту в воде (подвижная фаза А) и ацетонитрил, подкисленный 0,1% муравьиной кислоты (подвижная фаза Б). Начальное соотношение фаз составляло 50/50 об.% (А/Б), объем пробы в инжекторе - 10 мкл. В этих условиях время удерживания для аторвастатина составило 0,72 мин для ВС аторвастатина-d<sub>5</sub> 0,71 мин. Общее время анализа 3,5 мин.

Образцы интактной слюны в объеме 100 мкл переносили в микропробирки на 1,2 мл, добавляли 10 мкл раствора ВС (200 нг/мл), перемешивали при 1200 об/мин в течение 2 мин. Далее осаждали белки добавлением 400 мкл охлажденного ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) ацетонитрила, содержащего 0,1% муравьиной кислоты. Перемешивали при 1200 об/мин в течение 4 мин. Центрифугировали в течение 15 мин при 4000 об/мин ( $+4^{\circ}\text{C}$ ). Супернатант в количестве 300 мкл переносили в планшеты для упаривания и упаривали в токе азота досуха при  $40^{\circ}\text{C}$ . К сухому остатку добавляли 200 мкл реагента вода/ацетонитрил (1/1), перемешивали 4 мин. Далее переносили 190 мкл полученного раствора в 96-луночные микропланшеты для анализа. Калибровочные образцы для аторвастатина готовили в концентрациях 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 75, 160 и 200 нг/мл. Образцы КК - в концентрациях 1,5 нг/мл (низкий контроль качества, НКК), 60 нг/мл (средний контроль качества) и 150 нг/мл (высокий контроль качества). Калибровочные графики представляли собой линейную зависимость с нормированием 1/с и коэффициентом корреляции не менее 0,999. Концентрация ВС в образцах слюны составляла 20 нг/мл.

**Метод определения бисопролола.** Хроматографическое разделение бисопролола осуществляли на хроматографической колонке YMC-Triart С8, 1,9  $\mu\text{m}$ , 2,0 $\times$ 50 mm в градиентном режиме элюирования, начиная с 27% подвижной фазы Б, при скорости потока 0,4 мл/мин. В качестве подвижных фаз использовали формиат аммония 10мМ+0,2% муравьиной кислоты в воде (подвижная фаза А) и ацетонитрил, подкисленный 0,2% муравьиной кислоты (подвижная фаза Б), объем вкола - 4 мкл. Температура колонки составляла  $35^{\circ}\text{C}$ . В этих условиях время удерживания для бисопролола и ВС (бисопролола-d<sub>3</sub>) составило 0,92 мин. Общее время анализа 6 мин.

Образцы интактной слюны в объеме 200 мкл переносили в микропробирки, добавляли 10 мкл раствора ВС (400 нг/мл), перемешивали при 1200 об/мин в течение 2 мин. Проводили осаждение белков добавлением 300 мкл охлажденного ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) ацетонитрила, содержащего 0,1%

Таблица 1

Параметры работы МС-детектора для метода определения аторвастатина

Аналит	Q1>Q3 переход	Dwell, мсек	Напряжение на первом квадруполе (Q1 Pre Bias), В	Энергия соударений (CE), эВ	Напряжение на третьем квадруполе (Q3 Pre Bias), В
Аторвастатин	559,00>440,20	100	-24,0	-23,0	-30,0
Аторвастатин-d <sub>5</sub>	564,00>445,25	100	-24,0	-22,0	-21,0

Таблица 2

Параметры работы МС-детектора для метода определения бисопролола

Аналит	Q1>Q3 переход	Dwell, мсек	Напряжение на первом квадруполе (Q1 Pre Bias), В	Энергия соударений (CE), эВ	Напряжение на третьем квадруполе (Q3 Pre Bias), В
Бисопролол	326,10>116,05	100	-16	-19	-19
Бисопролол-d <sub>5</sub>	331,10>121,10	75	-17	-19	-21

MRM-переходы для ВС составили 326,10>116,05 (331,10>121,10 – бисопролол-d<sub>5</sub>). Скорости потока газа-осушителя и газа-распылителя установили соответственно на 15 л/мин и 3 л/мин. Температуры DL и НВ составили соответственно 180°C и 400°C. Первый и третий квадруполы работали в режиме высокого разрешения. Для MRM-перехода аналита, используемого для количественного анализа, время накопления сигнала (dwell time) задавали равным 100 и 75 мсек для внутреннего стандартного образца (табл. 2).

Результаты и обсуждение. В

ходе разработки методов определения аторвастатина и ВС с использованием растворов стандартных образцов и модельных проб найдены MRM-переходы для каждого из соединений, подобраны оптимальные параметры ионизации и хроматографического разделения; определены калибровочные диапазоны для каждого из аналитов. Отсутствие пиков аналита и ВС в холостых пробах говорят, как о селективности подобранных MRM-переходов (рис. 1), так и методе в целом. Отсутствие отклика аналита в образце с ВС, но без добавления аналита, указывает на отсутствии интерференции между целевым определяемым компонентом и ВС (рис. 2). Линейный диапазон определения аторвастатина составил от 0,5 до 200 нг/мл. На рис. 3 приведена хроматограмма аторвастатина на уровне нижнего предела количественного определения (НПКО) (0,5 нг/мл). Правильная форма пика, отношение сигнал/шум, равное 8 указывают, что определение аторвастатина возможно на уровне не менее 0,5 нг/мл. Хроматограмма холостого образца слюны (рис. 4) свидетельствует об отсутствии интерференции между ВС и аналитом. Селективность метода в отношении определяемого соединения подтверждено отсутствием отклика по времени удерживания бисопролола (0,92 мин) в пробе интактной слюны. Нижний предел количественного определения бисопролола в слюне человека составил 0,5 нг/мл при отношении сигнал/шум, равном 18. На рис. 5 приведена хроматограмма бисопролола на уровне НПКО. Пик целевого соединения характеризуется правильной гауссовой формой, отсутствуют признаки размывания и раздвоения. На рисунках 4, 5, 6 присутствует пик неудерживаемого компонента с временем удерживания 0,33 мин. Данный пик соответствует так называемому пику вкола. Площадь данного пика постоянна и не зависит от концентрации аналита, либо внутреннего стандарта в пробе, и, таким образом, его появление на хроматограммах объясняется матричными эффектами, которые действуют в конкретной сложной матрице, т.е. слюне человека. Высокое разрешение между пиком вкола и пиком целевого компонента, позволяет судить об отсутствии взаимного влияния между данными сигналами. Последнее позволяет сделать вывод о том, что наличие матричного пика вблизи мертвого времени хроматографической системы не сказывается на точности определения бисопролола. Приведенные методы определения содержания

муравьиной кислоты. Перемешивали на шейкере при 1200 об/мин в течение 4 мин. Центрифугировали в течение 15 мин при 4000 об/мин (+4°C). Надосадочную жидкость в количестве 300 мкл переносили в планшеты для упаривания и упаривали в токе азота досуха при 40°C. К сухому остатку добавляли 200 мкл раствора 10мМ AmF в воде/ACN (75/25) +0,1%FA, перемешивали на шейкере 4 мин и переносили 190 мкл полученного раствора в 96-луночные микропланшеты и анализировали. Калибровочные образцы для бисопролола готовили в концентрациях 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 75, 160 и 200 нг/мл. Образцы КК – в концентрациях 1,5 нг/мл (низкий контроль качества, НКК), 60 нг/мл (средний контроль качества, СКК) и 150 нг/мл (высокий контроль качества, ВКК). Калибровочные кривые представляли собой линейную зависимость с нормированием 1/с и коэффициентом корреляции не менее 0,999 в диапазоне концентраций 0,5-200 нг/мл для бисопролола. Концентрация ВС в образцах слюны составляла 40 нг/мл. При разработке условий масс-спектрометрического детектирования раствор тестируемого соединения в растворе ACN:H<sub>2</sub>O (1:1) с 0,1 % FA с концентрацией 100 нг/мл анализировали путем прямого ввода в масс-спектрометр шприцевым насосом при ионизации в электроспрее в режиме регистрации положительных ионов. При сканировании в режиме полного ионного тока (MS1) определяли: а) молекулярный ион исследуемого соединения; б) основные ионы-продукты фиксировали в режиме MS2. Для количественного анализа результата использовали параметры источника ионизации (температура линии десольватации – DL – и интерфейса – Heat Block (НВ), потоки газа распылителя (Nebulising Gas Flow) и газа-осушителя (Drying Gas Flow)). Использованы также параметры напряжения на первом (Q1 Pre Bias), третьем (Q3 Pre Bias) квадруполях. Энергия соударений была оптимизированы для достижения максимально-возможного сигнала MRM-переходов, необходимых для количественного определения целевых соединений.

MRM-переходы для аторвастатина составили 559,00>440,20 (564,00>445,25 – аторвастатин-d<sub>5</sub>). Скорости потока газа-осушителя и газа-распылителя установили соответственно на 15 л/мин и 3 л/мин. Температуры DL и НВ составили соответственно 250°C и 400°C. Первый и третий квадруполы работали в режиме высокого разрешения. Для каждого MRM-перехода, используемого для количественного анализа, время накопления сигнала (dwell time) задано равным 100 миллисекундам (мсек) (табл. 1).

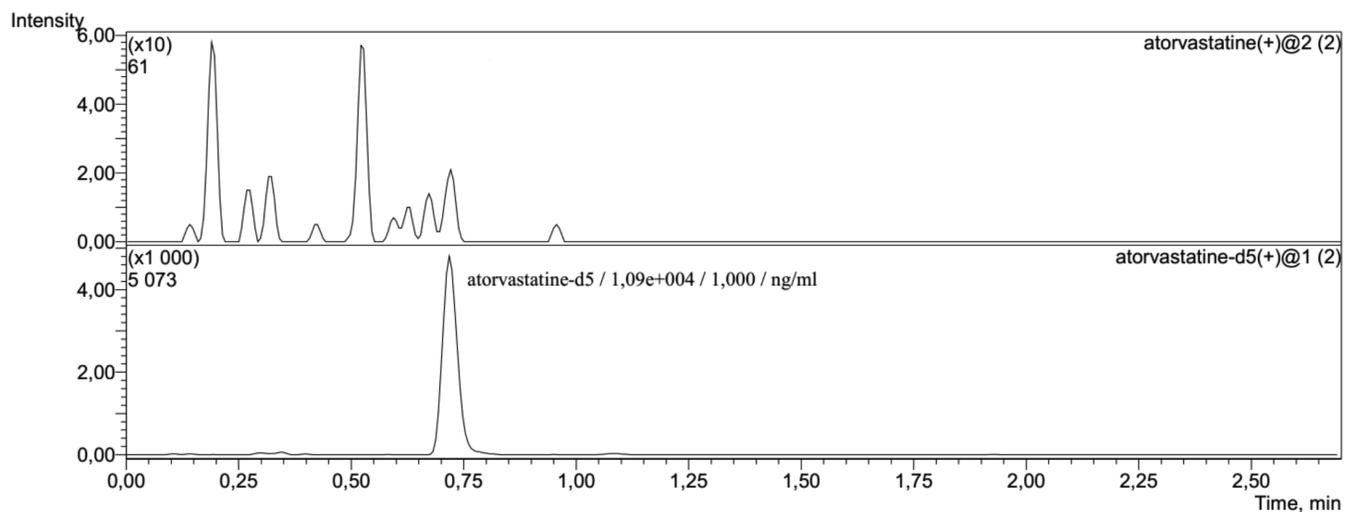


Рис. 1. Хроматограмма холостого образца.

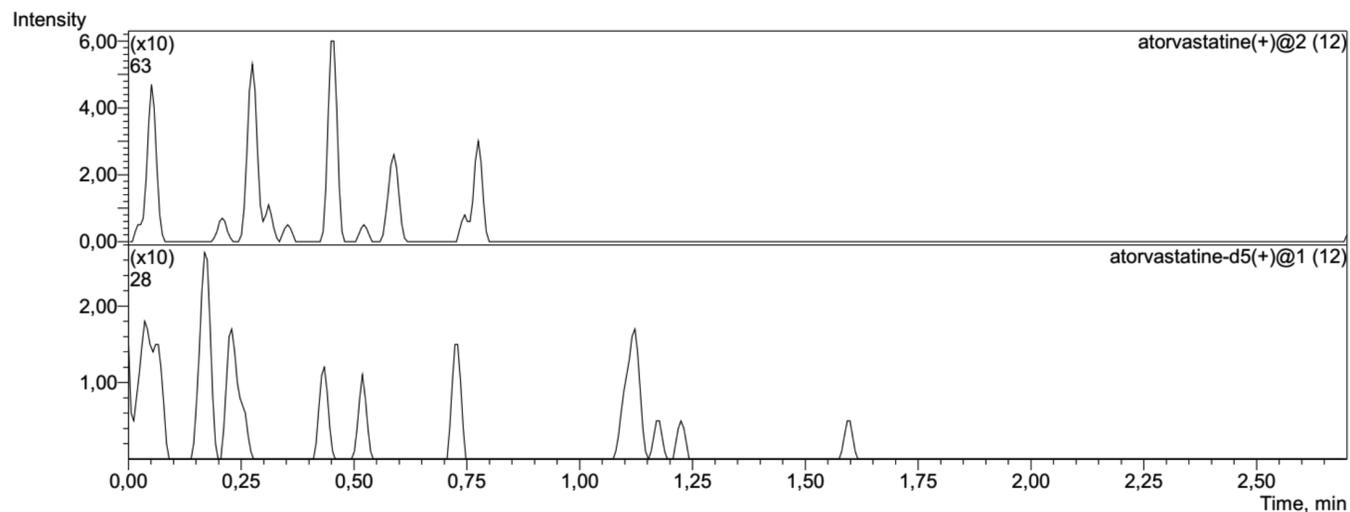


Рис.2. Хроматограмма образца интактной слюны.

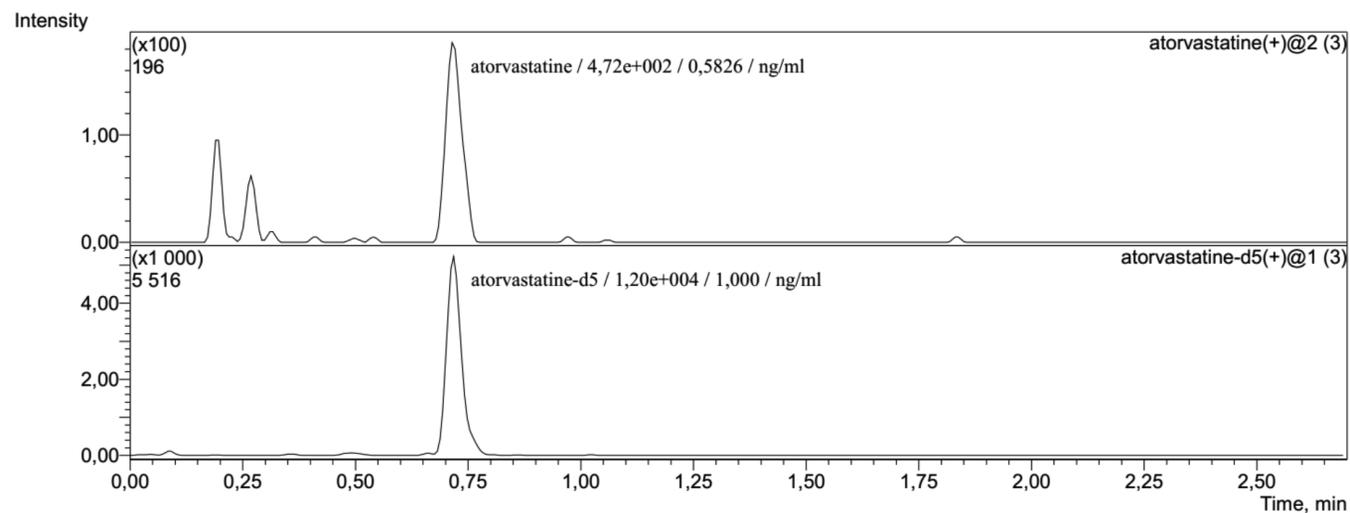


Рис. 3. Хроматограмма аторвастатина 0,5 нг/мл (НПКО) в слюне.

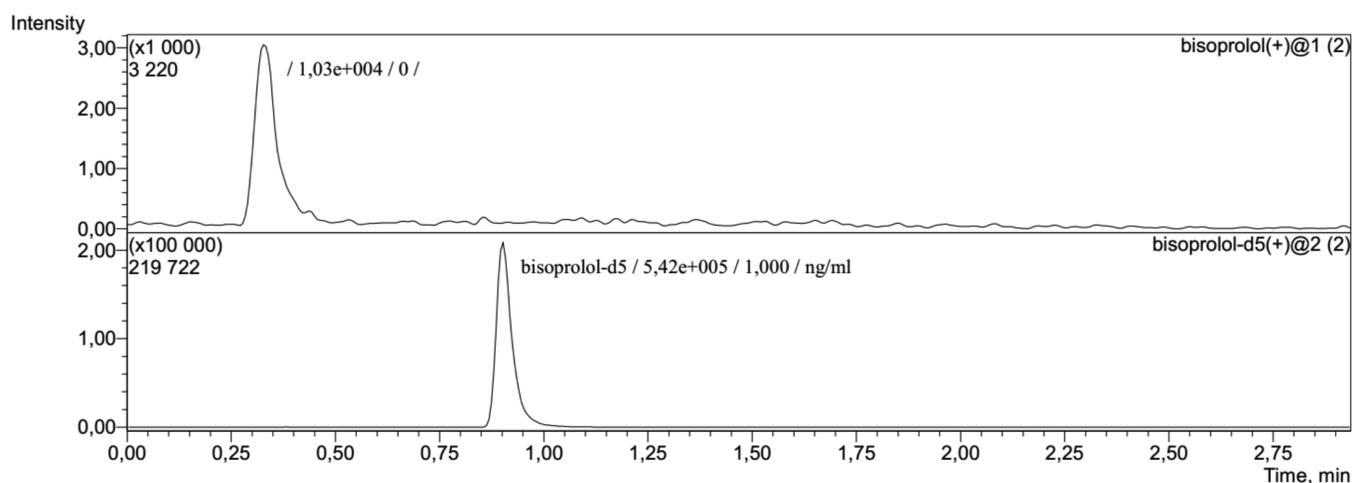


Рис. 4. Хроматограмма холостого образца.

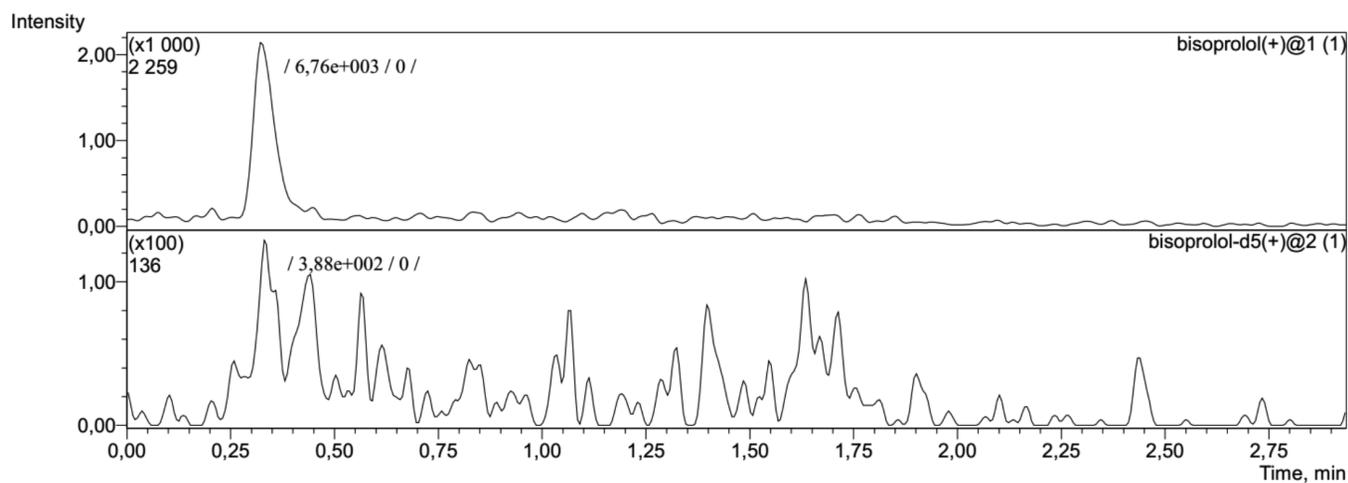


Рис. 5. Хроматограмма образца интактной слюны.

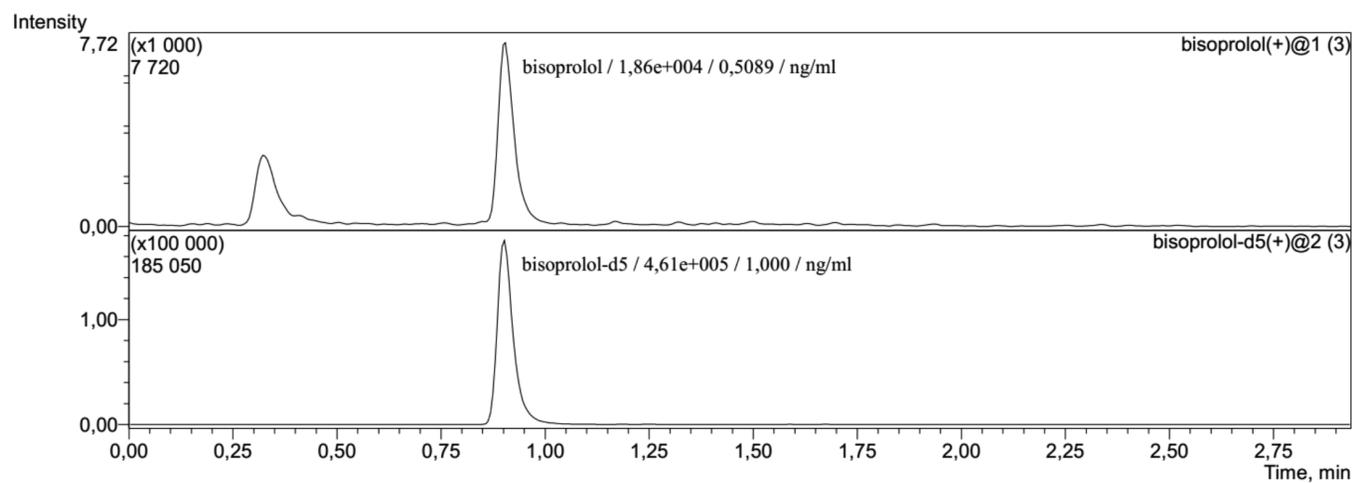


Рис. 6. Хроматограмма бисопролола 0,5 нг/мл (НПКО) в слюне.

Таблица 3

Результаты определения аторвастатина и бисопролола в пробах слюны пациентов

Название пробы	Концентрация аторвастатина, нг/мл	Концентрация бисопролола, нг/мл
1	1,208	1195*
2	BLOQ	121,2
3	2,608	2111*
4	BLOQ	80,19
5	1,143	373,6*
6	BLOQ	н/д
7	BLOQ	н/д
8	BLOQ	н/д
9	BLOQ	н/д
10	н/д	96,5
11	н/д	19,1
12	н/д	BLOQ
13	н/д	BLOQ
14	н/д	BLOQ
15	н/д	33,1
16	н/д	BLOQ

\*найденные концентрации превышают ВПКО (200 нг/мл для бисопролола) данного метода. н/д – анализ проб на определение анализа не проводился.

Таблица 4

Контроль качества аналитических серий определения аторвастатина и бисопролола

Аналит	Образцы КК, нг/мл	Использовано величин	Среднее, нг/мл	СО	КВ, %	Точность, %
Аторвастатин	1,5	3* из 4	1,461	0,0800	5,48	97,4
	60	4 из 4	56,21	1,08	1,93	93,7
	150	4 из 4	147,7	8,17	5,53	98,5
Бисопролол	1,5	4 из 4	1,475	0,0294	2,00	98,3
	60	4 из 4	58,01	1,60	2,75	96,7
	150	4 из 4	143,3	2,56	1,79	95,5

\* отклонение по точности определения концентрации в образце превысило 15%. Образец КК исключен из расчета. СО – стандартное отклонение. КВ – коэффициент вариации, рассчитан по формуле:  $KB = \frac{CO}{\text{Среднее}} \times 100\%$ .

аторвастатина и бисопролола можно применять к анализу проб слюны человека, отобранных после приема препарата, содержащего определяемые препараты.

Результаты определения аторвастатина и бисопролола в пробах слюны приводятся в табл. 3, где записью «BLOQ» обозначены концентрации ниже (НПКО) (0,5 нг/мл). Пробы слюны с 1–5 включительно - это пробы слюны, отбор которых производился у добровольцев (группа С) после приема аторвастатина и бисопролола одновременно.

Правильность полученных результатов определения подтверждена образцами КК, анализ которых проводили в рамках аналитической серии проб дважды: до и после реальных проб слюны. Отклонение образцов КК по точности составило не более 15% для, как минимум, трех повторов каждой из концентраций КК: 1,5 нг/мл (НКК), 60 нг/мл (СКК) и 150 нг/мл (ВКК), значения КВ не превышали 6,0% для всех аналитов (табл. 4.). Расчет статистических показателей в образцах КК проводили относительно номинального значения. Приведенные

данные иллюстрируют оптимальную точность определения содержания аторвастатина и бисопролола в реальных пробах слюны человека.

**Заключение.** Проведена апробация метода количественного определения фармпрепаратов - бисопролола и аторвастатина в слюне методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии с тройным квадруполом LCMS-8040 с ионизацией, разделением и детектированием образцов. Данный метод при полной его материализации, с большой вероятностью можно будет применять в экспериментальной и практической медицине для контроля за выведением и дозированием лекарственных средств.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 2, 4–8, 10–13 см. REFERENCES)

3. Вавилова Т.П., Янушевич О.О., Островская И.Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. М.: Бином; 2014.
9. Ремезова И.П., Лазарян Д.С., Максименко Т.И. Химико-токсикологический анализ респеридона и галоперидола в слюне. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* 2012; 4 (5-3): 754-6.
12. Лупанов В.П. Новые Европейские методические рекомендации 2013 г. по лечению стабильной ишемической болезни сердца. *Российский медицинский журнал.* 2014; 2: 98–105.

REFERENCES

1. Casolin A. Comparison of Urine and Oral Fluid for Workplace Drug Testing. *Journal Anal Toxicol.* 2016; 40(7): 479-85.
2. Lee D., Huestis M.A. Current Knowledge on Cannabinoids in Oral Fluid. *Drug Test Anal.* 2014; 6(0): 88-111.
3. Vavilova T.P., Yanushevich O.O., Ostrovskaya I.G. Saliva. Analytical capabilities and prospects. [Slyuna. Analiticheskie vozmozhnosti i perspektivy]. Moscow: Binom; 2014. (in Russian)
4. Aravindh Babu N., Balachander N., Masthan K.M.K., Gopalakrishnan T. Biomarkers in saliva. *Biomedical & pharmacology.* 2012; 5(2): 367-70.
5. Desrosiers N.A., Barnes A.J., Hartman R.L., Scheidweiler K.B., Kolbrich-Spargo E.A. et al. Oral Fluid and Plasma 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) and Metabolite Correlation after Controlled Oral MDMA Administration. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013; 405(12): 4067-76.
6. Bosker W.M. Oral fluid testing for drugs of abuse/ W.M. Bosker, M.A. Huestis *Clin. Chem.* 2009; 55:1910-31.
7. Aravindh Babu N. et al. Drug Excretion in Saliva. A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2014; 26(1) 11: 76-7.
8. Aps J.K., Martens L.C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int.* 2005; 150: 119-31.
9. Remezova I.P., Lazaryan D.S., Maksimenko T.I. Chemical-toxicological analysis of resperidone and haloperidol in saliva. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk.* 2012; 4 (5-3): 754-6. (in Russian)
10. Gentini S., Solmini R., Tittarelli R., Mannocchi G., Busardo F.P. A Study on the Reliability of an On-Site Oral Fluid Drug Test in a Recreational Context. *Anal. Methods Chem.* 2016; 2016: 1234581.
11. Lee D., Huestis M.A. Current Knowledge on Cannabinoids in Oral Fluid. *Drug Test Anal.* 2014; 6(0): 88-111.
12. Lupanov V.P. New European guidelines for the treatment of stable coronary heart disease in 2013. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal.* 2014; 2: 98–105. (in Russian)
13. Murphy C., Bennett K., Fahey T., Shelley E., Graham I., Kenny R.A. Statin use in adults at high risk of cardiovascular disease mortality: cross-sectional analysis of baseline data from The Irish Longitudinal Study on Ageing (TILDA). *BMJ Open.* 2015; 5(7): e008017.

Поступила 06.03.19

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.

### СОВРЕМЕННЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ФЕРРОКИНЕТИКИ В ДИАГНОСТИКЕ АНЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ С РАСПРОСТРАНЕННЫМИ СТАДИЯМИ ЛИМФОМЫ ХОДЖКИНА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИНТЕНСИВНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

*Оценка анемического синдрома (АС) проведена у 79 больных с распространенными стадиями лимфомы Ходжкина (ЛХ) на различных этапах химиотерапии (ХТ) по схеме EACOPP-14. На фоне проводимого лечения число эритроцитов и, соответственно, показатели HCT снижались с каждым последующим циклом химиотерапии (ЦХТ) и достигли максимального снижения к 5-, 6-му ЦХТ. Абсолютный дефицит железа (ЖДА), который сочетался с низким уровнем ЭПО, неадекватным степени тяжести анемии, выявлен у единичных больных ЛХ (5 чел, 6,3%). Функциональный дефицит железа (ФДЖ) диагностирован у 9 больных (11,4%), имел те же морфологические признаки, что и ЖДА, а именно, микроцитоз, гипохромия эритроцитов и низкое содержание гемоглобина в ретикулоцитах (RET-HE). В отличие от ЖДА у пациентов с ФДЖ концентрация ФР, ГП25 и ИЛ-6 были высокими. Несмотря на достаточно большие запасы железа, уровень рРТФ свидетельствовал о «железном голоде» эритрокариоцитов костного мозга, его показатель превышал верхнюю границу нормы, в то время как RET-HE был низким. У 34 (43 %) больных ЛХ выявили дефицит эндогенного эритропоэтина (ЭПО), который отмечался не только у пациентов с АХЗ, но и у больных с ЖДА. Более низкий уровень ЭПО выявлен у пациентов с лейкопенией и очень низкой эритропоэтической активностью костного мозга.*

**Ключевые слова:** лимфома Ходжкина; анемия; гепсидин; интерлейкин-6; ферритин; растворимые рецепторы трансферрина.

**Для цитирования:** Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В., Соменова О.В., Елизарова А.Л., Добровольская М.М. Современные метаболиты феррокинетики в диагностике анемического синдрома у больных с распространенными стадиями лимфомы Ходжкина при проведении интенсивной химиотерапии. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5): 277-283. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-277-283>

*Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V., Somonova O.V., Elizarova A.L., Dobrovolskaya M.M.*

#### MODERN FERROKINETICS METABOLITES IN THE DIAGNOSTICS OF ANEMIC IN PATIENTS WITH DISSEMINATED STAGES OF HODGKIN'S LYMPHOMA WHEN CONDUCTING INTENSIVE CHEMOTHERAPY

FSBI «National Medical Research Center of Oncology N.N. Blokhina «Ministry of Health of Russia, Moscow

*Evaluation of anemic syndrome (AS) was performed in 79 patients with advanced stages of Hodgkin's lymphoma (LH) at various stages of chemotherapy (CT) according to the EACOPP-14 scheme. Against the background of the treatment, the number of erythrocytes and, accordingly, the HCT indices decreased with each subsequent cycle of chemotherapy (CTC) and reached the maximum reduction to 5, 6 th CCT. Absolute iron deficiency (IDA), which was combined with a low level of EPO and an inadequate degree of anemia, was found in a few LH patients (5 people, 6.3%). Functional iron deficiency (FDZH) was diagnosed in 9 patients (11.4%), had the same morphological signs as IDA. Namely, microcytosis, erythrocyte hypochromia and low hemoglobin content in reticulocytes (RET-HE). In contrast to IDA, patients with FDZH concentration of FR, GP-25 and IL-6 were high. Despite the fairly large reserves of iron, the level of rRTF testified to the "iron hunger" of the erythrocaricytes of the bone marrow, its index exceeded the upper limit of the norm, while RET-HE was low. In 34 (43%) patients, LH revealed a deficiency of endogenous erythropoietin (EPO), which was observed not only in patients with AHZ, but also in patients with IDA. Lower levels of EPO were detected in patients with leukopenia and very low erythropoietic activity of the bone marrow.*

**Key words:** Hodgkin's lymphoma; anemia; hepcidin; interleukin-6; ferritin; soluble transferrin receptors.

**For citation:** Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V., Somonova O.V., Elizarova A.L., Dobrovolskaya M.M. Modern ferrokinetics metabolites in the diagnostics of anemic in patients with disseminated stages of Hodgkin's lymphoma when conducting intensive chemotherapy. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (5): 277-283 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-277-283>

**For correspondence:** Blindar V.N.; e-mail: [bld51@list.ru](mailto:bld51@list.ru)

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 28.03.2019

Accepted 03.04.2019

Известно, что лимфома Ходжкина (ЛХ) – первое онкологическое заболевание, при котором в середине XX в. была показана возможность излечения. К началу XXI эта злокачественная опухоль из абсолютно смертельной болезни превратилась в одну из самых высококурабельных [1]. С появлением новых, более эффективных программ лечения, число излечившихся больных возрастает. За последние 10 лет выживаемость больных увеличилась более чем на 11% [2-5]. Анемический синдром (АС) выявляется у больных ЛХ еще до начала лечения, его частота достигает 40–70% при распространенных стадиях, а на фоне химиотерапии (ХТ) АС становится более выраженным и развивается у большинства пациентов [6]. Чаще всего АС носит характер анемии хронического заболевания (АХЗ) и является самостоятельным неблагоприятным прогностическим признаком [7-9]. В настоящее время АС наряду с размером опухоли и стадией заболевания рассматривают как независимый фактор прогноза, влияющий на выживаемость [10-12]. Снижение качества жизни во время лечения и в первое время после его окончания, а также поздние осложнения противоопухолевой терапии ЛХ представляют важную медицинскую проблему, поскольку касаются, как правило, молодых людей с большой продолжительностью предстоящей жизни [13,4].

Патогенез АС больных ЛХ чрезвычайно сложен [14]. Он представлен большим разнообразием факторов, лежащих в основе его развития и, недостаточно изучен. Имеются данные о возможности использования гепсидина или в другой транскрипции, гепсидина [15, 16] как маркера дефицита железа при АХЗ. Вместе с тем клиническая значимость этого показателя окончательно не определена.

Цель работы – исследование основных метаболитов феррокинетики для выявления их роли в дифференциальной диагностике АС. Основной задачей была оценка показателей крови, определение которых, в дальнейшем, сможет помочь в ранней диагностике и адекватной коррекции АС больных ЛХ.

*Материал и методы.* Обследовано 79 больных с распространенными стадиями лимфомы Ходжкина в процессе химиотерапии, поступивших на лечение в «НМИЦ онкологии Н.Н. Блохина». Из них - 31 женщина в возрасте 18-48 лет (средний возраст  $28,7 \pm 1,2$ ) и 48 мужчин – 16-57 лет (средний возраст  $29,9 \pm 2,1$ ). Пациенты получали лечение по программе ЛХ Москва-1-3 для больных с распространенными стадиями ЛХ: 6 циклов полихимиотерапии по интенсифицированной схеме ЕАСОРР-14: эпозид по 100 мг/м кв в 1-3 дни цикла, адрибластин 50 мг/м кв в 1-й день, циклофосфан 650 мг/м кв в 1-й день, винкристин 1,4 мг/м кв (но не более 2мг) в 8-й день, прокарбазин по 100 мг/м кв с 1-го по 7-й дни (или дакарбазин 375 мг/м кв в 1-й день), преднизолон по 40 мг/м кв с 1-го по 7-й дни, колониестимулирующие факторы (G-CSF) вводились в плановом порядке, независимо от количества лейкоцитов с 9 по 13 дни. Цикл повторялся каждый 15-й день. Завершающим этапом была лучевая терапия на остаточную опухоль более 2,5 см. В схеме использовались стандартные дозы химиопрепаратов, но интенсификация достигалась за счет сокращения интервала между циклами до 7 дней при плановом использовании колониестимулирующих факторов. Исследование периферической крови проводилось перед каждым из 6 циклов химиотерапии на гематологическом анализаторе Sysmex ХЕ-2100. Из показателей красной крови помимо

числа эритроцитов (RBC) и содержания в них гемоглобина (HGB) оценивали расчетные показатели: средний объем эритроцита (MCV), среднее содержание (MCH) и фрагментоцитов (FRC). Анализировали абсолютное и относительное число ретикулоцитов (RET) и ретикулоцитарные индексы, характеризующие степень зрелости RET — число мелких (зрелые формы - LFR), средних, крупных (молодые формы – MFR, HFR) и отдельно число незрелых форм (IRF) как сумму крупных и средних RET. Исследовали концентрацию гемоглобина в ретикулоците (RET-HE). Вычислялись расчетные ретикулоцитарные индексы: CRC (Corrected Reticulocyte Count) — скорректированный подсчет числа ретикулоцитов — и RPI (Reticulocyte production index) — индекс продукции ретикулоцитов. С помощью иммуноферментного анализа определяли содержание ферритина (ФР) наборами фирмы «Orgentec Diagnostika GmbH» (Германия), растворимый рецептор трансферрина (рТФР) — наборами фирмы «BioVendor» (Чехия) и уровень эндогенного эритропоэтина (ЭПО) — наборами фирмы «Biomera» (США), гепсидина 25 (ГП25) с наборами «Peninsula Laboratories International, Inc.» (США) и интерлейкин-6 (ИЛ-6)- с помощью наборов Bender MedSystem (Австрия). Для исключения аутоиммунной гемолитической анемии всем больным ставили прямую пробу Кумбса, подсчитывали лейкоцитарную формулу и изучали морфологию эритроцитов. Для исключения внутрисосудистого гемолиза эритроцитов исследовали содержание свободного HGB плазмы (СГЕМ). Свободный гемоглобин определяли гемиглобинцианидным методом. Число микро- и макроцитов, гипо- и гиперхромных эритроцитов определяли на анализаторе Advia-120 (США). В качестве контрольной группы исследование аналогичных показателей крови проведено у 49 здоровых лиц (сотрудники, доноры).

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 Хельсинской декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией.

*Результаты и обсуждение.* В настоящее время стандартом лечения распространенных стадий ЛХ является полихимиотерапия. Проведение интенсивной полихимиотерапии сопровождается значительным угнетением гемопоэза, в том числе и эритроидного ростка. Известно, что у больных с гематологическими заболеваниями химиотерапия может усугублять анемию посредством прямого токсического действия на костный мозг. Наше исследование показало, что при проведении интенсивной программы ЕАСОРР-14 число WBC, RBC и, соответственно, показатели НСТ снижались с каждым последующим циклом химиотерапии (ЦХТ) и достигли максимального снижения к 5-, 6-му ЦХТ с более выраженной степенью достоверности по сравнению с циклами (табл. 1, см. рисунок).

Такая же особенность прослеживалась и при анализе показателей HGB. Он был низким на всех этапах ХТ, и, как следовало ожидать, более глубокое ( $p=0,01, 0,001$ ) снижение отмечалось на 5-6-м ЦХТ (см. рисунок). Напротив, показатели MCV и MCH были меньше, чем в

Таблица 1

**Показатели периферической крови больных лимфомой Ходжкина на фоне химиотерапии (x±m)**

Показатели	Контроль (n=49)	2 ЦХТ (n=24)	3 ЦХТ (n=13)	4 ЦХТ (n=13)	5 ЦХТ (n=17)	6 ЦХТ (n=12)
WBC(x10 <sup>9</sup> /л)	7,2±0,18	11,6±1,4*	4,6±1,3	9,3±2,5	5,4±1,1	4,3±1,1**
RBC (x10 <sup>12</sup> /л)	4,85±0,5	3,6±0,3*	3,6±0,09*	3,4±0,1*	3,1±0,1**	2,5±0,1**
HGB (г/л)	149±7,1	94±0,6*	97±3,08*	94±0,3*	84±2,0*	73±0,3**
HCT (%)	43,4±0,6	29,4±1,4*	29,8±0,9*	28,7±1,2*	25,4±0,6**	22,4±1,1**
MCV (fl)	89,2±0,6	79,8±1,9*	80,7±1,8*	81,7±1,6*	84,1±1,2*	88,9±2,7
MCH (pg)	30,4±0,2	25,1±0,9*	26,2±0,9*	26,8±0,6*	27,8±0,6	28,5±0,7
FRC (%)	0,2±0,04	1,9±0,02*	1,3±0,05*	1,8±0,7*	1,6±0,3*	1,5±0,3*
MICRO (%)	0,6±0,01	7,4±1,5*	7,7±2,6*	8,9±1,9*	8,0±2,7*	4,7±0,3*
HYPO (%)	0,5±0,08	8,0±1,8*	5,7±2,7*	3,1±0,7*	2,2±0,6*	6,7±1,7*
MACRO (%)	0,4±0,06	2,0±0,05*	1,2±0,2*	1,3±0,5*	1,7±0,3*	5,1±0,5**
HYPHER (%)	0,7±0,09	2,1±0,03*	2,6±0,1*	3,4±0,6*	4,8±0,6**	4,7±0,1**
NORMOBLAST	0±0	0,1±0,01*	0,2±0,05*	0,3±0,05*	0,8±0,8**	0,9±0,1**

Примечание. Здесь и в табл. 2-5: WBC – лейкоциты; RBC – эритроциты; HGB – гемоглобин; HCT – гематокрит; MCV – объем эритроцитов; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците; FRC – фрагменты разрушенных эритроцитов; MICRO – эритроциты небольшого объема; HYPO – эритроциты со сниженным содержанием гемоглобина; MACRO – эритроциты большого объема; HYPHER – эритроциты с высоким содержанием гемоглобина; NORMOBLAST – эритроциты содержат ядра.

\* – различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы (p<0,05); \*\* – различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы (p<0,01).

Таблица 2

**Ретикулоцитарные индексы больных лимфомой Ходжкина на фоне химиотерапии (X±m)**

Показатели	Доноры (n=49)	2 ЦХТ (n=24)	3 ЦХТ (n=13)	4 ЦХТ (n=13)	5 ЦХТ (n=17)	6 ЦХТ (n=12)
RET (%)	1,1±0,04	1,32±0,3	0,8±0,06	1,9±0,5*	2,3±0,3*	1,6±0,2*
Диапазон	(0,6-1,8)	(0,4-4,1)	(0,2-3,8)	(0,2-5,5)	(0,1- 4,3)	(0,2-3,6)
RET (x10 <sup>9</sup> /л)	42,7±3,4	54,2±0,1	77,5±2,7	51,2±2,5	57,0±2,0	53,0±1,2
IRF (%)	8,2±0,1	31,7,9±6,8*	16,8±4,3*	23,1±5,6*	35,9±4,6*	18,4±5,3*
LFR (%)	91,8±0,3	69,7±6,8*	83,1±4,3*	75,7±6,7*	66,1±4,5*	83,5±5,3*
MFR(%)	7,4±0,3	16,5±2,7*	12,0±2,4*	15,3±3,6*	19,2±2,3*	10,4±3,0*
HFR (%)	0,8±0,1	13,7±3,9*	12,0±2,0*	10,1±3,3*	14,5±2,3*	6,2±2,3*
RET-HE (пг)	36,4±0,3	32±1,5	33,4±1,4	35,4±1,2	36,2±1,0	29,9±2,0
Диапазон	(28-35)	(19-36)	(28-39)	(26-38)	(24-41)	(19-38)
RPI (ед)	2- 3	0,6±0,2	0,3±0,1*	0,7±0,05*	1,1±0,3*	0,9±0,1*
Диапазон	2-3	(0,1-1,7)	(0,03-1,4)	(0,03-1,7)	(0,2-3,3)	0,1-2,9)

Примечание. RET – ретикулоциты; IRF – число незрелых ретикулоцитов, как сумма HFR+MFR; LFR – мелкие формы (зрелые RET); MFR – средние формы RET; HFR – крупные (молодые RET); RET-HE – среднее содержание гемоглобина в ретикулоците; RPI – показатель эффективности высвобождения ретикулоцитов из костного мозга.

\* – различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы (p<0,05); \*\* – различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы (p<0,01).

контрольной группе только перед 2-м, 3-м и 4-м ЦХТ, с каждым последующим ЦХТ, объем эритроцитов и среднее содержание гемоглобина в эритроците нарастали и к 6-му ЦХТ приближались к верхней границе нормы. Другая закономерность прослеживалась при анализе показателей, отражающая качественные характеристики эритроцитов. Так, на всех ЦХТ выявлялись разные популяции эритроцитов, как со сниженным объемом и средним содержанием гемоглобина, так и, с большим объемом и гиперхромией. При морфологическом исследовании в мазках крови встречались нормобласты, начиная со 2-го ЦХТ и на последующих этапах лечения. Отмечался пойкилоцитоз эритроцитов (каплевидные и мишеневидные формы, стоматоциты и шизоциты) более выраженный перед 5-м и 6-м ЦХТ, что свидетельствовало о неэффективном эритропоэзе. Значительное

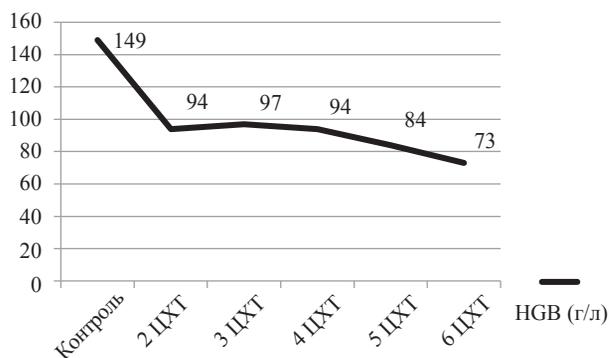
(p=0,001) повышение показателя FRC - числа разрушенных эритроцитов, что может также отражать этот процесс.

Ретикулоциты – это молодые эритроциты, они первыми информируют о состоянии эритропоэза в костном мозге. Общее число ретикулоцитов, как в относительных, так и абсолютных цифрах значительно колебались от очень низких (0,1-0,3%), до высоких значений (3,7-5,6%) на разных циклах химиотерапии.

Анализ показателей ретикулоцитарных индексов, параметров, отражающих степень зрелости ретикулоцитов, выявил отклонения среди более молодых популяций RET. Эта закономерность прослеживалась на всех циклах химиотерапии (табл. 2).

Индексы IRF, MFR, HFR, были значительно (p=0,05) выше, чем в группе контроля. В то же время зрелая по-

ГЕМАТОЛОГИЯ



Динамика показателей гемоглобина периферической крови пациентов ЛХ в процессе химиотерапии.

По оси ординат – показатели гемоглобина (HGB) г/л, по оси абсцисс – курсы химиотерапии.

пуляция (LFR) статистически значимо была ниже. Среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах, индекс RET-HE, в среднем по всем группам был в пределах нормы, однако отмечался разброс показателей, встречались как очень низкие, так и высокие значения. Индекс продукции ретикулоцитов (RPI), отражающий активность эритропоэза, был значительно снижен на всех этапах обследования, что свидетельствовало о низкой эритропоэтической активности костного мозга на фоне ХТ. Диапазон значений значительно колебался, наряду с низкими показателями RPI (0,1 ед), выявлены пациенты с высокой активностью эритропоэза (2,9 ед).

Высокоинформативным маркером, характеризующим метаболизм железа в организме, является ферритин (ФР). ФР отражает интегральный показатель оценки запаса железа в организме. Концентрация ФР оказалась очень высокой перед всеми ЦХТ, с большой степенью достоверности ( $p=0,01$ ) по сравнению с контрольной группой (табл.3). Выявлены, наряду с очень высокими показателями уровня ФР (800-2095 нг/мл), единичные случаи очень низкой концентрации ФР (12-27,6 нг/мл), а также встречались показатели, которые не превышали верхней границы нормы (до 300 нг/мл).

Значительный уровень ФР у больных на фоне ХТ, можно объяснить поступлением избытка так называемого цитозольного ФР, в результате распада клеток опухоли и сокращения плацдарма кроветворения в костном мозге в процессе ХТ.

Однако ФР не всегда объективен в оценке метаболизма железа, так как является белком острой фазы воспаления, значительно увеличивается при нарушении функции печени и у онкологических больных, особенно на фоне ХТ. Более информативным тестом является измерение рРТФ. В отличие от ФР, концентрация рРТФ повышается при недостатке железа и существенно не изменяется при хронических болезнях. Таким образом, определение концентрации рРТФ, наряду с ФР, в значительной степени повышает точность лабораторного диагноза железодефицитного состояния у больных со злокачественными и сопутствующими хроническими заболеваниями.

Концентрация рРТФ в обследуемых группах, в отличие от ФР, была в пределах нормы, однако со значительными колебаниями показателей, как от очень низких

Таблица 3

**Показатели ферритина, растворимых рецепторов трансферрина, эндогенного эритропоэтина в плазме крови у больных лимфомой Ходжкина на фоне химиотерапии (X±m)**

Пациенты	Значения	Ферритин (нг/мл)	Растворимые рецепторы трансферрина (Мкг/мл)	Эндогенный эритропоэтин (Ме/мл)
Доноры:	X±m	108,0±11,9	0,9±0,08	15,4±3,7
Мужчины (n=19)	разброс	(36,6 - 235,0)	(0,3-1,1)	(3,7-35,3)
	Медиана	79,3	0,7	20,1
Женщины (n=30)	X±m	67,7±10,5	0,9±0,08	15,4±3,7
	разброс	(25-132)	(0,3-1,1)	(3,7-35,3)
перед 2-м ЦХТ (n=17)	Медиана	49,7	0,7	20,1
	X±m	724,1±190,5*	1,7±0,35*	179±88,1*
	разброс	(47,2-1642)	(0,41-3,7)	(24,9-114,5)
	медиана	409,3	1,5	43,7
перед 3-м ЦХТ (n=11)	X±m	508,4±200,9*	0,81±0,1	292,9±42,1*
	разброс	(52-1543)	(0,3-1,4)	(99,2-1263)
	медиана	356,6	0,8	49
	X±m	269,1±38,5	0,9±0,2	171,9±55,7*
перед 4-м ЦХТ (n=17)	разброс	(12-490)	(0,07-1,8)	(9,7-1114)
	медиана	242,5	1,1	43,7
перед 5-м ЦХТ (n=19)	X±m	659,6±135,1*	0,93±0,1	204,5±61,3*
	разброс	(12-2095)	(0,5-1,8)	(2,6-890)
	медиана	492	1,0	137
	X±m	608,35±153,4	0,8±0,1	342,9±65,3*
перед 6-м ЦХТ (n=15)	разброс	(120-1678)	(0,3-1,4)	(23,7-702)
	медиана	448,3	0,655	338,9

Примечание. \* - различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы ( $p<0,05$ ); \*\* - различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы ( $p<0,01$ ).

**Сравнительная характеристика показателей крови у пациентов лимфомой Ходжкина на фоне химиотерапии с различными формами анемии**

Показатели	Контроль (n=49)	ЖДА (n=5)	ФДЖ (n=9)	АХЗ с НЭПО (n=34)	АХЗ с АДЭПО (n=45)
RBC ( $\times 10^{12}$ /л)	4,85±0,5	4,3±0,8*	3,2±0,4*	3,1±0,5*	3,2±0,1*
HGB (г/л)	149±7,1	98±1,1*	84±5,0*	84±3,9*	88±3,0*
MCV (fl)	89,2±0,6	67,9±4,9**	77,9±0,8*	84,5±1,5	84±1,3
MCH (pg)	30,4±0,2	24,9±2,1**	26±1,3*	27,8±0,5	28,2±0,5
MICRO (%00)	0,6±0,01	28,1±3,4**	6,4±1,2*	8,2±2,0*	4,1±0,9*
HYPO (%)	0,5±0,08	22,2±1,7**	11,4±2,2**	4,1±0,9*	3,7±1,2*
MACRO (%)	0,4±0,06	2,7±0,05*	5,6±1,3*	2,6±0,03*	2,9±0,08*
HYPHER (%)	0,7±0,09	1,3±0,04*	1,4±0,5*	4,4±0,2*	5,9±0,2*
RET (%)	1,1±0,04	0,7±0,03	1,8±0,2*	1,4±0,6	2,6±0,05*
RET-HE (пг)	36,5±0,3	22,8±2,7*	25,2±1,1*	34,5±1,1	34,6±0,7
RPI (ед)	2-3	0,6±0,05*	1,3±0,3*	0,3±0,04*	1,4±0,1*
ФР (нг/мл)	96,1±13,6	17,5±4,1	590,6±197,5	422,4±73,1	539,9±109,5
pPTФ (мкг/мл)	0,9±0,08	3,2±0,5**	1,6±0,1*	1,1±0,05	1,1±0,2
ЭПО (мЕ/мл)	15,4±2,7	22±8,4**	42,3±6,6*	34,2±3,7**	308,1±52,6**
ГП25 (нг/мл)	4,3±0,7	2,3±0,06*	39,4±1,7**	-----	-----
ИЛ-6 (пг/мл)	2,0±0,06	1,2±0,03*	27,9±2,9**	-----	-----

Примечание. ФДЖ – функциональный дефицит железа; АХЗ с НЭПО – анемия хронического заболевания с неадекватной концентрацией эритропоэтина; АХЗ с АДЭПО – анемия хронического заболевания с адекватной концентрацией эритропоэтина.

\* – различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы ( $p < 0,05$ ); \*\* – различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы ( $p < 0,01$ ).

(0,07 мкг/мл), так и более умеренных, приближающихся к верхней границе нормы (2,7 мкг/мл) и единичных высоких показателей (3,7 мкг/мл).

Основными патогенетическими факторами, вызывающими снижение уровня гемоглобина при химиотерапии, является миелосупрессия и снижение выработки ЭПО. Большое значение для дифференциальной диагностики АС имеет определение ЭПО в плазме крови. ЭПО является ключевым регулятором эритропоэза. Данный гормон стимулирует пролиферацию и дифференцировку эритроидных предшественников в костном мозге и одновременно подавляет их апоптоз. Синтез и секреция ЭПО играют важную патофизиологическую роль в развитии первичных и вторичных нарушений эритрона, приводящих к изменению устойчивого эритроцитарного равновесия. Повышенная продукция ЭПО при анемиях может быть компенсаторной и адекватной, то есть направленной на приспособление организма к изменениям оксигенации тканей и на приведение числа эритроцитов в соответствие с потребностями организма в кислороде [17, 18].

Анализ полученного материала показал, что средний уровень ЭПО перед всеми ЦХТ пациентов с ЛХ был высоким. Однако показатели значительно варьировали. Наряду с высокими цифрами, превышающими верхнюю границу нормы более чем в 10 раз, отмечен низкий уровень ЭПО. Низкая продукция ЭПО (2,6-59,1 мЕ/мл) выявлена у 34 чел. (40 %). Однако, более чем у половины пациентов (45 чел-60 %) отмечен высокий уровень ЭПО (147,3 – 1263 мЕ/мл), адекватный относительной тяжести анемии.

Детальный анализ лабораторных данных больных ЛХ показал, что анемия у них была в основном легкой (I) и умеренной (II) степени. АС первой степени выявлен у 29 пациентов, 2-й — у 35, 3-й — у 8, 4-й — у 7 человек. Среди всех пациентов преобладали больные с анемией

хронического заболевания (АХЗ) и относительно низкой эритропоэтической активностью костного мозга, которая констатирована во всех группах. Отмечены единичные случаи железодефицитной анемии (ЖДА) и острой аутоиммунной гемолитической анемии. Выраженный макроцитоз и гиперхромия эритроцитов, у отдельных пациентов, не исключал дефицита витаминов В-12 или фолиевой кислоты на фоне АХЗ.

У одного пациента выявили положительную прямую пробу Кумбса, свидетельствующую о наличии аутоантител на эритроцитах. Значительная концентрация (0,9 г/л, норма до 0,4 г/л) свободного гемоглобина не исключала аутоиммунной гемолитической анемии с внутрисосудистым гемолизом. В периферической крови отмечался выраженный ретикулоцитоз, полихромазия и агглютинация эритроцитов.

ЖДА, на фоне АХЗ, диагностирована только у 5-ти человек (6,3 %). Средний уровень гемоглобина, в этой группе соответствовал первой степени анемии с сохраненным числом эритроцитов, сниженным их объемом и средним содержанием гемоглобина в эритроцитах и ретикулоцитах. Содержание ФР, ГП25, ИЛ-6 у пациентов с ЖДА было статистически значимо ниже, чем в группе контроля. Напротив, концентрация pPTФ превышала норму почти в 3 раза, что свидетельствовало об абсолютном или истинном дефиците железа. При этом наряду с дефицитом железа, отмечался низкий уровень ЭПО. У всех пациентов с ЖДА продукция ЭПО оказалась неадекватной степени анемии.

В свою очередь, среди пациентов с АХЗ (n=79) были выделены еще три группы: 1-я группа больных, АС которых характеризовался как АХЗ с функциональным дефицитом железа (ФДЖ) и неадекватной продукцией ЭПО. 2-я – АХЗ с относительно низкой продукцией ЭПО (34 чел.), неадекватной степени анемии. 3-я – АХЗ с высоким уровнем ЭПО (45 чел.) (табл. 4).

Сравнительная характеристика показателей крови пациентов с лимфомой Ходжкина в зависимости от числа лейкоцитов

Показатели	WBC <4,0 x10 <sup>9</sup> /л (n=28)	WBC от 4,0 до 10 x10 <sup>9</sup> /л (n=22)	WBC >10,0 x10 <sup>9</sup> /л (n=29)
RBC (x10 <sup>12</sup> /л)	2,8±0,15	3,2±0,1	3,8±0,1*
HGB (г/л)	83±3,2	86±3,3	99±3,0*
HCT (%)	24,5±0,9	27±0,1	30,8±0,8*
RET (%)	0,7±0,1	2,3±0,3*	2,7±0,4*
RET-HE(pg)	33,5±0,7	29,3±0,3	32,7±1,1
RPI (ед)	0,3±0,07	1,5±0,2*	1,8±0,3*
ФР (нг/мл)	539,8±109,8	485±38,2	668,8±194,5
pPTФ (мкг/мл)	1,1±0,02	1,2±0,2	0,9±0,1
ЭПО (МЕ/мл)	85,4±6,2	168±24,3	353,9±72,4*
НЭПО (%)	85,7*(24 чел)	31,8 (7 чел)*	10,3 (3 чел.)
ФДЖ(%)	10,7 (3 чел)	13,6 (3 чел)	6,9(2 чел)
ЖДА (%)	3,5 (1)	9 (2 чел.)	6,9 (2 чел)

Примечание: НЭПО – неадекватный эритропоэтин.

\* – различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы ( $p < 0,05$ ); \*\* – различия показателей по сравнению с группой контроля статистически значимы ( $p < 0,01$ ).

У 9 больных (11,4%) ЛХ АС характеризовался как АХЗ с функциональным дефицитом железа (ФДЖ) и неадекватной продукцией ЭПО. ФДЖ имел те же морфологические признаки, что и ЖДА, а именно – микроцитоз и гипохромия. В отличие от ЖДА у пациентов с ФДЖ концентрация Ф, ГП25 и ИЛ-6 были высокими. Несмотря на достаточные запасы железа, уровень pPTФ говорил о «железном голоде» эритроцитов костного мозга, его показатель превышал верхнюю границу нормы. Напротив, среднее содержание гемоглобина в ретикулоците было сниженным, что свидетельствовало о функциональном дефиците железа. Наиболее общим звеном патогенеза АС является участие провоспалительных цитокинов, которые, индуцируют экспрессию гепатоцитами гормона ГП25. В настоящее время считают, что основную роль в метаболизме железа играет ГП25. ГП25 является 25-аминокислотным пептидом, который синтезируется в печени [15]. 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 ферропортина — основного клеточного транспортера железа и рецептора для ГП25. ГП25 снижает функциональную активность ферропортина, связывается с ним и вызывает его деградацию. Показано [15], что под воздействием ИЛ-6 ГП25 блокирует ферропортины и, следовательно, высвобождение железа макрофагами развивается функциональный дефицит железа.

АХЗ с неадекватным уровнем эритроцитов и АХЗ с адекватным уровнем эритроцитов, по своим основным показателям, существенно не отличались друг от друга. Исключение составили сравнения ЭПО и индекса RPI, отражающих активность эритропоэза, они были достоверно ниже у пациентов с АХЗ и неэффективным эритропоэзом. Как в первой, так, и в другой группе присутствовали разные популяции эритроцитов. Выявлялись, как микроцитарные и гипохромные эритроциты, так и значительное число эритроцитов с большим объемом и

гиперхромией. Следует отметить, что число эритроцитов с характеристиками MICRO и NYPO было значительно ниже, чем у пациентов с ЖДА и ФДЖ. Показатель RET-HE в обеих группах был в пределах верхней границы нормы.

На следующем этапе проведен анализ показателей крови пациентов в зависимости от числа лейкоцитов или степени восстановления гемопоэза. Оказалось, что самые низкие показатели красной крови, в том числе и скорость эритропоэза, констатированы у пациентов с выраженной лейкопенией. Соответственно, самые высокие значения выявлены у пациентов с WBC более 10,0 x10<sup>9</sup> /л. Концентрация ФР была высокой во всех группах со значительным разбросом. У большинства (около 90%) пациентов с WBC менее 4,0 x10<sup>9</sup> /л уровень ЭПО был относительно невысоким, в отличие от группы с высокими WBC, где ЭПО, наоборот, был неадекватен у единичных больных. Продукция ЭПО была неадекватной и во 2-й группе, но в меньшей степени, только у 7 человек (31,8%). ФДЖ и ЖДА встречались почти в равной степени во всех группах.

**Выводы:** Абсолютный дефицит железа на фоне АХЗ, который сочетался с низким уровнем ЭПО, выявлен у единичных больных ЛХ с распространенными стадиями в процессе химиотерапии (5 чел. – 6,3%).

АХЗ с функциональным дефицитом железа диагностирована у 9 человек (11,4%) с распространенными стадиями ЛХ в процессе химиотерапии. Руководствуясь тем, что ФР не всегда объективен в оценке метаболизма железа, для дифференциальной диагностики АХЗ с ФДЖ необходимо опираться на pPTФ, ГП25, ИЛ-6 и среднее содержание гемоглобина в ретикулоцитах. Первые будут высокими, второе – снижено на фоне значительной концентрации ФР.

Ценным предиктором ответа на лечение анемического синдрома у больных с распространенными стадиями лимфомы Ходжкина является исходный уровень сыровоточного ЭПО. Точное измерение уровней ЭПО в крови имеет как диагностическое, так и терапевтическое значение. Наше исследование показало, что у 34 (43%) больных имеется дефицит эндогенного ЭПО, который отмечался не только у пациентов с ФДЖ, но и у боль-

ных с ЖДА и аутоиммунной гемолитической анемией. Низкий уровень ЭПО, в большей степени, выявлялся у пациентов с лейкопенией и очень низкой эритропоэтической активностью костного мозга.

У большинства пациентов с распространенными стадиями ЛХ на фоне проводимой химиотерапии отмечалось активное восстановление гемопоэза и, соответственно, высокая скорость эритропоэза, которая, чаще всего, сочеталась с продукцией эритропоэтина, адекватной относительной тяжести анемии.

Для исключения АИГА, особенно у пациентов с числом ретикулоцитов более 5%, необходимо проводить исследование на прямую пробу Кумбса и свободный гемоглобин в плазме крови.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 6–12, 14–16 см. REFERENCES)

1. Демина Е.А. Brentuximab vedotin: новые возможности лечения рецидивов и рефрактерных форм лимфомы Ходжкина. *Онкогематология*. 2016; 9(4): 398—405.
4. Аршанская Е.Г. Семочкин С.В., Румянцев А.Г. Качество жизни подростков и молодых взрослых с длительными ремиссиями лимфомы Ходжкина. *Клиническая онкогематология*. 2014; 7(2):184—91.
5. Демина Е.А. Лимфома Ходжкина. *Клиническая онкогематология*. 2015; 8(4): 463—70.
13. Филатова Л.В., Тарасенкова А.А., Семиглазова Т.Ю., Гершанович М.Л. Основные подходы к терапии рефрактерных форм и рецидивов лимфомы Ходжкина. *Вопросы онкологии*. 2012; 58(4): 443—53.
17. Зубрихина Г.Н. Блиндарь В.Н., Матвеева И.И. Анемический синдром у онкологических больных. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН*. 2009; 20(4): 57—62.
18. Павлов А.Д., Моршчакова Е.Ф., Румянцев А.Г. Эритропоэз, эритропоэтин, железо. Молекулярные и клинические аспекты. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011.

#### REFERENCES

1. Demina E.A. Brentuximab vedotin: new treatment options for relapses and refractory forms of Hodgkin's lymphoma. *Onkogematologiya*. 2016; 9(4): 398—405. (in Russian)
2. Canellos G.P., Rosenberg S.A., Friedberg J. W., Lister T.A., DeVita V.T. Treatment of Hodgkin Lymphoma: A 50-Year Perspective. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32(3): 163—8.
3. Engert A, Diehl V, Franklin J, Lohri A, Dörken B, Ludwig, W. D.

- et al. Escalated-dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: 10 years of follow-up of the GHSG HD9 study. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27 (27): 4548—54.
4. Arshanskaya E.G. Semochkin S.V., Romyancev A.G. Quality of life in adolescents and young adults with long-term remissions of Hodgkin's lymphoma. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2014; 7(2):184—91. (in Russian)
5. Demina E.A. Hodgkin's lymphoma. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2015; 8(4):463—70. (in Russian)
6. Barrett-Lee P, Ludwig J. H, Birgegard G., Bokemeyer C., Gascon P., Kosmidis P.A. et al Independent risk factors for anemia in cancer patients receiving chemotherapy: results from the European Cancer Anemia Survey. *Oncology*. 2006; 70 (1): 34—48.
7. Josting A., Engert A., Diehl V., Canellos G.P Prognostic factors and treatment outcome in patients with primary progressive and relapsed Hodgkin's disease. *Ann. Oncol.* 2002; 13 (Supplement 1): 112—6.
8. Bierman, P.J., Lynch J.C., Whalen V.L., Kessinger A., Vose J.M., Armitage J.O. The international prognostic factors project score for advanced Hodgkin's disease is useful for predicting outcome of autologous hematopoietic stem cell. *Ann. Oncol.* 2002; 13(9): 1370—7.
9. Stanca O., Lupu A.M., Ciobanu A.R., Ghimici C., Triantafyllidis I., Colita A. et al. Onset risk factors and treatment response features of refractory Hodgkin lymphoma. *Maedica (Buchar)*. 2013; 8(4): 343—6.
10. Caro J. J., Salas V., Ward A., Goss G. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systemic, quantitative review. *Cancer*. 2001; 91: 2214—21.
11. Hasenclever D., Diehl V. N. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Projecton Advanced Hodgkin's Disease. *Engl. Med.* 1998; 339 (2):1506—14.
12. Brice P. Managing relapsed and refractory Hodgkin Lymphoma. *Brit. J. Haematol.* 2008; 141(1): 3—13.
13. Filatova L.V., Tarasenkova A.A., Semiglazova T.Yu., Gershanovich M.L. The main approaches to the treatment of refractory forms and recurrence of Hodgkin's lymphoma. *Voprosy onkologii*. 2012;58(4): 443—53. (in Russian)
14. Thomas C., Thomas L. Anemia of chronic disease: pathophysiology and laboratory diagnosis. *Lab. Hemat.* 2005; 1(1): 14—23.
15. Ganz T., Nemeth E. Heparin and disorders of iron metabolism. *Annu. Rev. Med.* 2011; 62: 347—60.
16. Coyne D. Heparin: clinical utility as a diagnostic tool and the therapeutic target. *Kidney Int.* 2011; 80(3): 240—9.
17. Zubrikhina G.N. Bлиндарь V.N., Matveeva I.I. Anemic syndrome in cancer patients. *Vestnik RONC im. N.N. Blohina RAMN*. 2009; 20(4): 57—62. (in Russian)
18. Pavlov A.D., Morshchakova E.F., Romyancev A.G. Erythropoiesis, erythropoietin, iron. [Molekulyarnye i klinicheskie aspekty. Monografiya]. Moscow: GEHOTAR- Media; 2011. (in Russian)

Поступила 28.03.19  
Принята к печати 03.04.19

## ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Сарибекян Э.К., Зикирходжаев А.Д., Славнова Е.Н., Бруслинская А.Б., Суркова В.С., Ортабаева Д.Р., Петров А.Н.

### ВОЗМОЖНОСТИ ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛАКТИРУЮЩЕЙ АДЕНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ)

Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 125284, Москва, Россия

*Представлен клинический случай наличия лактирующей аденомы у женщины на сроке 32 недель беременности. Представлены типичные признаки образования, выявленные клинико-инструментальными и цитологическими методами, позволившими диагностировать новообразование на дооперационном этапе и подтвердить гистологическим исследованием операционного материала.*

**Ключевые слова:** лактирующая аденома; интраканаликулярная фиброаденома; листовидная опухоль; доброкачественные новообразования молочной железы.

**Для цитирования:** Сарибекян Э.К., Зикирходжаев А.Д., Славнова Е.Н., Бруслинская А.Б., Суркова В.С., Ортабаева Д.Р., Петров А.Н. Возможности цитологической диагностики лактирующей аденомы молочной железы (клиническое наблюдение). Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5): 284-286.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-284-286>

Saribekyan E.K., Zikirjakhodzaev A.D., Bruslinskaya A.B., Surkova V.S., E.N.Slavnova, Ortabaeva D.R., Petrov A.N.

POSSIBILITIES OF CYTOLOGICAL DIAGNOSTICS OF LACTATED BREAST ADENOMA. CLINICAL REPORT

P.Hertsen's Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Centre of Radiology of the Ministry of Public Health of Russian Federation

*We describe a case of lactating adenoma in pregnant woman, 32 week of gestation. Typical features of disease presented in this article was revealed by clinical and microscopic methods and it make possible to diagnose the process before operation. The diagnosis was confirmed by histological investigation of surgical material.*

**Key words:** lactating adenoma; intracanalicular fibroadenoma; phylloid adenoma; breast tumor benign.

**For correspondence:** Slavnova E.N., Doctor of Medical Sciences, lead researcher of the Department of Cytology; e-mail: slavnov@rambler.ru

**For citation:** Saribekyan E.K., Zikirjakhodzaev A.D., Bruslinskaya A.B., Surkova V.S., E.N.Slavnova, Ortabaeva D.R., Petrov A.N. Possibilities of cytological diagnostics of lactated breast adenoma. clinical report. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (5): 284-286 (in Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-284-286>

Received 15.04.2019

Accepted 18.04.2019

Аденомы молочной железы – это доброкачественные опухоли, развивающиеся из клеток железистого эпителия. Их подразделяют на трубчатые, лактирующие, апокриновые, протоковые и так называемые полиморфные (т.е. доброкачественные смешанные опухоли) аденомы [11]. За исключением лактирующих и трубчатых аденом, остальные формы аденом являются редкостью. Лактирующие и трубчатые аденомы встречаются в репродуктивном возрасте. Лактирующие аденомы (ЛА) являются наиболее распространенными опухолями молочной железы, возникающими во время беременности и в послеродовом периоде. ЛА представлены одиночными или множественными, пальпируемыми, свободноподвижными новообразованиями молочной железы, которые чаще всего имеют небольшой размер (менее

3 см). Для ЛА характерна гиперплазия долек с увеличением количества ацинусов, выстланных активно секретирующими клетками в виде шестигранников. ЛА может также развиваться и из добавочной доли молочной железы в эктопических местах, таких как подмышки, стенки грудной клетки или вульвы [1,4, 7, 8,13,14].

Некоторые морфологи считают, что лактирующие аденомы возникают *de novo*, тогда как другие считают их вариантами ранее существовавших тубулярных аденом, фиброаденом или участков дольковой гиперплазии, отражающих морфологические изменения, связанные с физиологическим состоянием беременности [7,9].

Хотя новообразование может самопроизвольно подвергаться инволюции, хирургическое удаление бывает необходимо из-за масс-эффекта опухоли. В случаях, когда кормление грудью не вызывает беспокойства, может быть назначена медикаментозная терапия с целью уменьшения опухоли. ЛА обычно не рецидивирует локально, и нет проверенных данных о ее злокачественном

**Для корреспонденции:** Славнова Елена Николаевна д-р мед. наук, цитолог, вед. науч. сотр. отделения онкоцитологии; e-mail: slavnov@rambler.ru

потенциале [7,8]. Однако, в литературе описаны случаи карциномы, возникающей в тубулярных аденомах [2,3]. В связи с тем, что тубулярные аденомы и лактирующие аденомы во многом схожи и могут быть вариантами одной и той же опухоли, можно предполагать, что ЛА также могут быть связаны с повышенным риском рака в определенных случаях. A.Saglam и соавт.[10] наблюдали клинический случай, свидетельствующий о том, что из лактирующей аденомы может развиваться инфильтративный рак молочной железы. По их мнению, данные изменения происходят из-за влияния пролактина и прогестерона. Тубулярная аденома молочной железы (также называют чисто аденомой) представлена как одиночная, хорошо очерченная твердая опухоль. Рентгенологически она может внешне походить на некальцифицированную фиброаденому. Гистологически определяются плотные трубчатые или ацинарные структуры правильной формы [12]. Лактирующие и трубчатые аденомы (истинные аденомы молочной железы) можно отличить от фиброаденомы по наличию скудной стромы. K.James и соавт. [6] считают, что лактирующая аденома является локальным аномальным ответом ткани молочной железы беременной женщины на гормональные изменения, обусловленные беременностью. Основным иммуноцитохимическим отличием, которое наблюдали между нормальной тканью молочной железы беременной и «лактирующей» аденомой было то, что нормальная ткань молочной железы беременной слабо экспрессирует белок S100 и актин.

A.L.Volckmar и соавт. [15], используя целевую последовательность 50 генов, связанных с раком, а также секвенирование Sanger, проанализировали когорту из 18 аденом молочной железы, включающую 9 протоковых, 6 тубулярных и 3 лактационных аденом. Миссенс-мутации были обнаружены в 8 из 18 случаев (44%). В частности, пять (56%) протоковых аденом и три (50%) тубулярные аденомы содержали мутированные гены. Мутаций в лактирующих аденомах обнаружено не было. Трансформация ЛА в фиброаденому увеличивает риск развития карциномы молочной железы [5].

Диагностика ЛА не представляет особых трудностей. Отсутствие дозовой нагрузки при выполнении УЗИ делает данный метод диагностики приоритетным для беременных и лактирующих женщин. Применение соноэластографии может дать дополнительную качественную (цветовое картирование) и количественную информацию (коэффициенты жесткости) о природе заболевания.

*Описание клинического наблюдения.* В настоящей статье мы приводим описание клинического случая: наличия лактирующей фиброаденомы молочной железы (МЖ) у молодой женщины, обратившейся в МНИОИ им. П.А. Герцена по поводу быстрорастущего пальпируемого образования в правой молочной железе. Пациентка Б., 32 года, 32 недели беременности. Менструальная функция с 14 лет, месячные нерегулярные. В 20 лет - гинекологический аборт. В возрасте 26 лет обследована у гинеколога в связи с нерегулярными месячными. Выявлены высокие показатели пролактина. При магнитно-резонансной томографии головного мозга (МРТ) – обнаружена микроаденома гипофиза. Прочей патологии не выявлено, функция щитовидной железы не нарушена. Назначен дестинекс, который принимала 6 лет. При контрольной МРТ, на фоне 1 года приема дестинекса, отмечена положительная динамика - узел практически не определяется. В последующем МРТ не проводили.

Менструальная функция нормализовалась. В возрасте 32 лет вышла замуж, забеременела. На сроке 28 недель беременности обнаружила уплотнение в правой МЖ, которое увеличивалось в размере.

При обращении: молочные железы небольшого размера, изменены в соответствии с 3 триместром беременности – МЖ увеличены, сосково-ареолярные комплексы гиперпигментированы, соски увеличены, напряжены. В правой МЖ, на границе ареолы и внутренних квадрантов, пальпируется новообразование диаметром 4,0 см, округлой формы, плотно-эластической консистенции, подвижное, безболезненное.

При ультразвуковом исследовании (УЗИ) образование размер 5,5x4,0x4,0 см, контур четкий, ровный, края гладкие. Имеется небольшой эффект дистального усиления сигнала. При соноэластографии коэффициент 0,9. Заключение: лактирующая аденома. Под контролем УЗИ произведена тонкоигольная аспирационная биопсия образования.

*Цитологическое исследование.* В цитологических препаратах наблюдали обильный клеточный состав из кубических клеток. Некоторые клетки с эксцентрически расположенными овальными или округлыми ядрами, с центрально расположенными ядрышками и обильной вакуолизированной цитоплазмой, в апикальной части которой расположены жировые капельки и секреторные вакуоли. Клетки расположены разрозненно, группами, скоплениями и железистоподобными структурами. Фон препарата составляли бесструктурные белковые массы и капли жира (рис.1, см.обложку). Эти цитологические данные следует рассматривать в свете беременности или лактационного статуса женщины, чтобы не переоценивать их «атипичный» внешний вид. Должна быть исключена вероятность муцинозной карциномы во время беременности. При наличии цитологически подозрительных элементов в аспирате необходимо гистологическое исследование с помощью core-биопсии. Произведена хирургическая операция - удаление новообразования правой молочной железы под местной анестезией 40 мл 0,25% раствора новокаина. После периареолярного разреза кожи, частично тупым, частично острым (электронож, изогнутые электроножницы) путем выделено и удалено новообразование. Полость ушита кистным швом нитью Vicryl 3.0, внутрикожный шов нитью Monocryl 4.0. Послеоперационный период протекал без осложнений.

*Гистологическое исследование.* Макроскопическое описание: плотно-эластичный опухолевидный узел размерами 5,0x3,8x2,7 см, на разрезе ткань желтовато-серая, дольчатая, прилежащая ткань размерами 3,0x2,0x0,8 см (рис.2, см.обложку). При микроскопическом исследовании в ткани молочной железы определялся хорошо отграниченный узел с выраженной клеточной стромой, представленный агрегатами сливающихся гиперплазированных долек молочной железы с секреторными изменениями. Протоковые структуры молочной железы выстланы однорядным секреторным эпителием с вакуолизированной цитоплазмой, ядра однородные. Просветы заполнены мономорфным белесоватым секретом (рис.3,4, см.обложку).

Послеоперационный период протекал без осложнений. У больной проведены своевременные роды путём оперативного родоразрешения (кесарево сечение). После родов отмечалась гипогалактия в обеих МЖ, в связи с чем ребенок получал прикорм. При контрольном

осмотре спустя 3 месяца после операции и 9 дней после родов пациентка жалоб не предъявляла. Лактостаза не было. Отмечен хороший эстетический эффект - форма молочных желез без изменений, послеоперационный рубец гладкий, подвижный, малозаметный.

**Заключение.** На основании данных литературы и собственного опыта можем сделать следующие заключения. Лактирующая аденома – доброкачественное новообразование МЖ, которое развивается в период беременности и кормления. Опухоль не влияет на состояние молочной железы в процессе её типичных изменений при беременности и кормлении грудью. По данным клинико-инструментальных и морфологических методов исследования лактирующая аденома мало отличима от фиброаденомы молочной железы, либо тубулярной аденомы. При быстром росте и большом размере может имитировать филоидную аденому (листовидную опухоль). Морфологическая диагностика лактирующей аденомы возможна цитологически с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии. В случае наличия в цитограмме подозрительных «атипичных» клеток для исключения муцинозного рака необходимо гистологическое подтверждение с помощью core-биопсии. Учитывая появление и развитие лактирующей аденомы в периоды гормональных изменений у молодых женщин, сопряженных с риском стимулирования злокачественного роста новообразований, в случае их наличия, необходима гистологическая верификация опухоли путем core-биопсии и желателно хирургическое удаление новообразования.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Baker T. P., Lenert J.T., Kushwaha A., Evans G., Hunt K.K. Lactating adenoma: a diagnosis of exclusion. *The breast journal*. 2001; 7 (5): 354-7.

2. Domoto H., Tsuda H., Miyakawa K., Shinoda A., Nanasawa T. Invasive ductal carcinoma associated with tubular adenoma of the breast. *Pathology international*. 2002; 52 (3): 244-8.
3. Dupont W. D., Page D.L., Parl F.F., Vnencak-Jones C.L., Plummer W.D., Rados M.S. et al. Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. *New England Journal of Medicine*. 1994; 331 (1): 10-5.
4. Guray M., Sahin A. A. Benign breast diseases: classification, diagnosis, and management. *The oncologist*. 2006; 11 (5): 435-49.
5. Hill R. P., Miller F. N. Adenomas of the breast. With case report of carcinomatous transformation in an adenoma. *Cancer*. 1954; 7 (2): 318-24.
6. James K., Bridger J., Anthony P. P. Breast tumour of pregnancy ('lactating' adenoma). *The Journal of pathology*. 1988; 156 (1): 37-44.
7. Pinamonti M., Zanconati F. Breast Cytopathology. Assessing the Value of FNAC in the Diagnosis of Breast Lesions. - London: Karger; 2018.
8. Reeves M. E., Tabuenca A. Lactating adenoma presenting as a giant breast mass. *Surgery*. 2000; 127 (5): 586-8.
9. Rosen P. P., Oberman H. A. Benign epithelial lesions. Atlas of tumor pathology, 3<sup>rd</sup> series. *Tumors of the mammary gland*. 1993; 7: 67-100.
10. Saglam A., Can B. Coexistence of lactating adenoma and invasive ductal adenocarcinoma of the breast in a pregnant woman. *Journal of clinical pathology*. 2005; 58 (1): 87-9.
11. Silverberg S. G., DeLellis R. A. Silverberg's principles and practice of surgical pathology and cytopathology. London, United Kingdom. Elsevier Health Sciences; 2006.
12. Soo M.S., Dash N., Bentley R., Lee L. H., Nathan G. Tubular adenomas of the breast: imaging findings with histologic correlation. *American Journal of Roentgenology*. 2000; 174 (3): 757-61.
13. Stuart J.Schnitt., Laura C.Cjllins. Biopsy Interpretation of the Breast. London, United Kingdom. Lippincot Willians@Wilkins; 2009.
14. Syed A.Hoda., Edi Brogi., Frederick. C. Korner., Paul Peter Rosen. Rosen's Breast Pathology. London: Lippincot Willians@Wilkins; 2014.
15. Volckmar A. L., Leichsenring J., Flechtenmacher C., Pfarr N., Siebolts U. et al. Tubular, lactating, and ductal adenomas are devoid of MED12 Exon2 mutations, and ductal adenomas show recurrent mutations in GNAS and the PI3K-AKT pathway. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2017; 56 (1): 11-7.

Поступила 15.04.19

Принята к печати 20.04.19

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Карзакова Л.М.<sup>1,2</sup>, Кудряшов С.И.<sup>1</sup>, Шестипалова М.В.<sup>2</sup>, Леонтьева Е.В.<sup>3</sup>

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ В МОЧЕ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», 428015, Чебоксары, Россия;

<sup>2</sup>БУ «Городская клиническая больница №1» Минздрава Чувашской Республики, 428028, Чебоксары, Россия;

<sup>3</sup>БУ «Республиканская клиническая больница Минздрава Чувашской Республики, 428015, Чебоксары, Россия

В работе представлены данные по изучению содержания цитокинов (IL-1 $\beta$ , RAIL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) в утренней моче методом иммуноферментного анализа у здоровых лиц (n=20) и у больных острым гломерулонефритом (n=93). Определение уровней цитокинов у больных проведено в дебюте заболевания и спустя 12 месяцев после манифестации заболевания. Полученные показатели содержания цитокинов в моче представлены в виде абсолютных значений в пг/мл и нормализованных по креатинину значений, рассчитанных по формуле: уровень цитокина (пг/мл)/креатинин мочи (мкмоль/мл). Проведено изучение изменения содержания цитокинов в моче при гломерулонефрите относительно группы здоровых лиц, а также – динамики содержания цитокинов в моче за 12-месячный период наблюдения. Результаты проведенного исследования показали, что абсолютные значения цитокинов в моче могут искажать истинную картину цитокинового профиля мочи при патологии почек. Нормализованные значения преобладающего числа про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-10, IL-17A и TNF- $\alpha$ ) у больных гломерулонефритом оказались существенно выше соответствующих показателей здоровых лиц. Нормализованные значения цитокинов проявили как более чувствительные показатели, нежели абсолютные значения, в ходе анализа различий в цитокиновом профиле у больных гломерулонефритом в зависимости от острого и хронического течения заболевания. Данные показатели влияли на исход гломерулонефрита, оцениваемый, как правило, спустя 12 месяцев после манифестации заболевания. Так, обнаруженные в дебюте заболевания низкие уровни IL-1 $\beta$ , IL-8 и IL-17A в сочетании с высоким значением содержания RAIL-1 $\beta$  определяли хронизацию гломерулонефрита. Итак, нормализованные по креатинину значения содержания цитокинов в моче расширяют возможности использования оценки цитокинового профиля мочи для установления изменений в содержании цитокинов в моче при патологии почек и прогнозирования характера клинического течения гломерулонефрита.

Ключевые слова: гломерулонефрит; цитокины; хронизация гломерулонефрита.

**Для цитирования:** Карзакова Л.М., Кудряшов С.И., Шестипалова М.В., Леонтьева Е.В. Определение уровней цитокинов в моче в клинической практике. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5):287-293.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-287-293>

Карзакова Л.М.<sup>1,2</sup>, С. Кудряшов С.И.<sup>1</sup>, Шестипалова М.В.<sup>2</sup>, Е. Леонтьева Е.В.<sup>3</sup>

### DETERMINING OF CYTOKINE LEVELS IN THE URINE IN CLINICAL PRACTICE

<sup>1</sup>The Ulyanov Chuvash State University, Russia, 428015, Cheboksary;

<sup>2</sup>City Clinical Hospital №1 of Health Care Ministry of Chuvashia, Russia, 428028, Cheboksary;

<sup>3</sup>Republican Clinical Hospital of Health Care Ministry of Chuvashia, Russia, 428018, Cheboksary

The paper presents data on the study of the content of cytokines (IL-1 $\beta$ , RAIL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) in the morning urine using enzyme immunoassay in healthy individuals (n = 20) and in patients with acute glomerulonephritis (n = 93). The determination of cytokine levels in patients was carried out in the debut of the disease and 12 months after the onset of the disease. The obtained indicators of cytokine content in the urine are presented as absolute values in pg/ml and creatinine-normalized values calculated by the formula: cytokine level (pg/ml) / urine creatinine ( $\mu$ mol/ml). The study was made of changes in the content of cytokines in the urine of patients with glomerulonephritis with respect to a group of healthy individuals, as well as the dynamics of the content of cytokines in the urine during the 12-month observation period. The results of the study showed that the absolute values of cytokines in urine can distort the true picture of the cytokine profile of urine in renal pathology. Normalized values of the predominant number of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-10, IL-17A and TNF- $\alpha$ ) in patients with glomerulonephritis were significantly higher than the corresponding indicators of healthy individuals. The normalized values of cytokines were shown to be as more sensitive indicators than absolute values in the course of analyzing differences in the cytokine profile in patients with glomerulonephritis, depending on chronic and acute course of the disease. These indicators influenced the outcome of glomerulonephritis, assessed, as a rule, 12 months after the onset of the disease. Thus, the low levels of IL-1 $\beta$ , IL-8 and IL-17A detected in the debut of the disease in combination with the high level of RAIL-1 $\beta$  determined the chronization of glomerulonephritis. So, the creatinine-normalized cytokine levels in the urine expand the possibilities of using the evaluation of the cytokine profile of urine to establish changes in the cytokine content in the urine in renal pathology and predict the chronization of glomerulonephritis.

Key words: glomerulonephritis; cytokines; chronicity of glomerulonephritis.

**For citation:** Karzakova L.M., Kudryashov S.I., Shestipalova M.V., Leontyeva E.V. Determining of cytokine levels in the urine in clinical practice. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (5): 287-293 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-287-293>

**For correspondence:** Karzakova L.M., Dr. Sci. Med., Head of the department of internal diseases «Chuvashskii` state university; e-mail: [luzak58@mail.ru](mailto:luzak58@mail.ru)

**Information about authors:**

Karzakova L.M., <http://orcid.org/0000-0002-5899-6352>

Kudryashov S.I., <http://orcid.org/0000-0003-2277-9425>

Shestipalova M.V. <https://orcid.org/0000-0003-1369-3902>

Leontyeva E.V. <https://orcid.org/0000-0002-3914-7451>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 22.01.2019  
Accepted 15.04.2019

**Введение.** В последние годы уделялось много внимания изучению цитокинового профиля у больных с различной патологией, в том числе – с заболеваниями почек [1–4]. При этом авторы занимались преимущественно исследованием содержания цитокинов в сыворотке крови [1–3]. Однако циркулирующие в крови цитокины могут быть блокированы собственными растворимыми рецепторами или рецепторными антагонистами [4], что ограничивает использование показателей содержания цитокинов в крови в целях оценки цитокинового статуса при различных патологических состояниях. Не вызывает сомнения, что цитокины оказывают свое действие *in situ* в месте своей продукции, следовательно изучение содержания цитокинов в моче при заболеваниях почек может быть более информативным, чем определение их сывороточных уровней. В связи с приведенным предпринято настоящее исследование, целью которого явилась оценка информативности показателей содержания про- и противовоспалительных цитокинов в моче у здоровых лиц и при патологии почек, примером которой служило широко распространенное гломерулярное заболевание – гломерулонефрит (ГН).

**Материал и методы.** В ходе исследования производили забор образцов мочи для определения в них содержания цитокинов – IL-1 $\beta$  (интерлейкин-1 $\beta$ ), RAIP-1 $\beta$  (рецепторный антагонист интерлейкина-1 $\beta$ ), IL-2 (интерлейкин-2), IL-4 (интерлейкин-4), IL-10 (интерлейкин-10), TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$  (интерферон- $\gamma$ ) у практически здоровых лиц (20 человек в возрасте от 23 до 60 лет, средний возраст 34,2 $\pm$ 2,9 года) и у больных постинфекционным гломерулонефритом (ПИГН), получавших стационарное лечение в нефрологическом отделении Республиканской клинической больницы Минздрава Чувашии в 2012 – 2017 гг. (93 человека, в возрасте от 21 до 63 лет, средний возраст 36,4 $\pm$ 2,1 года). Отобранные порции мочи центрифугировали в течение 10 мин при 1000 g, затем супернатант отделяли для исследования в пластиковые пробирки. Для изучения взаимосвязи мочевых и сывороточных уровней цитокинов, дополнительно к исследованию уровней цитокинов в моче определяли содержание цитокинов выше указанного спектра в сыворотке крови. Отобранные для исследования образцы мочи и сыворотки крови хранились при -70 $^{\circ}$ С до проведения исследования. У больных ПИГН тестирование цитокинов в моче проводили дважды – в период дебюта заболевания при поступлении на стационарное

лечение (1-2-й дни от момента госпитализации) и через 12 месяцев после выписки из стационара. Больные были распределены ретроспективно через 12 месяцев в 2 группы в зависимости от результатов общеклинического обследования. В первую группу вошли пациенты – реконвалесценты после перенесенного острого ПИГН, во вторую – больные хроническим ПИГН, у которых через год после манифестации заболевания продолжали сохраняться клинические симптомы и изменения в моче, характерные для ГН (гипертензия, отеки, снижение скорости клубочковой фильтрации – СКФ – ниже 60 мл/мин, протеинурия, гематурия, лейкоцитурия, у части цилиндрурия). На следующий этап исследования было отобрано по 30 человек из каждой группы больных. При отборе пациентов добивались рандомизации групп по гендерно-возрастному, социальному составу, морфологическим формам ПИГН.

Диагностику ПИГН проводили на основе анализа клинического статуса пациентов, анамнестических данных, результатов лабораторного исследования крови и мочи, исследования почек на ультразвуковом аппарате “SSD” фирмы “Aloka” (Япония), морфологического исследования нефробиоптатов больных методом световой и люминесцентной микроскопии. Количественное определение цитокинов осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ООО «Цитокин» (С-Петербург) по методикам производителя лабораторных реагентов на иммуноферментном анализаторе Immunomat «Инститют Вирион/Серион ГмбХ», Германия). Полученные в ходе исследования результаты обрабатывали с помощью статистического аппарата компьютерной программы «Statistica – v. 10.0». Предварительно проводили проверку распределения полученных значений уровней цитокинов в моче и крови на соответствие нормальному (Гауссовому) распределению с помощью теста Колмогорова – Смирнова с поправкой Лиллиефорса. При условии, что достигнутые уровни значимости (p) были ниже критического значения, равного 0,05, отвергали нулевую гипотезу о сходстве изучаемых признаков с нормальным распределением. Использование данного подхода позволило установить асимметричность распределения совокупности значений содержания цитокинов в моче и сыворотке крови в исследуемых группах больных и у здоровых лиц, в связи с чем полученные данные представляли в виде  $Me (P_{10} - P_{90})$ , где  $Me$  – медиана,  $P_{10}$  – значение 10-го перцентиля,  $P_{90}$  – значение 90-го перцентиля. Для оценки

различий значений показателей в группах исследования использовали непараметрический критерий Манна-Уитни ( $p_{m-w}$ ). При проведении корреляционного анализа изучаемых показателей вычисляли коэффициент корреляции рангов Спирмена ( $r_s$ ), корреляционная связь считалась достоверной при  $p_{rs} < 0,05$ .

**Результаты. Цитокины в моче у здоровых лиц.** Результаты корреляционного анализа показателей цитокринового статуса в группе здоровых выявили прямую корреляцию сывороточных и мочевых уровней у двух цитокинов – IL-2 ( $r_s = 0,47$ ,  $p_{rs} = 0,035$ ) и RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,78$ ,  $p_{rs} = 0,001$ ), в то время как у остальных цитокинов отсутствовала взаимосвязь между количеством выделяемой с мочой цитокина и его содержанием в сыворотке крови. Установлено существование восьми положительных связей между уровнями циркулирующих в крови цитокинов, и лишь две из них прослеживались в уровнях цитокинов в моче – это связь между парами цитокинов IL-1 $\beta$  – RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,75$ ) и TNF $\alpha$  – IFN- $\gamma$  ( $r_s = 0,47$ ). При этом в моче обнаруживался ряд корреляционных связей, не характерных для сывороточных уровней: между мочевыми уровнями IL-1 $\beta$  и IL-4 ( $r_s = 0,84$ ), IL-1 $\beta$  и IL-10 ( $r_s = 0,66$ ), IL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$  ( $r_s = 0,55$ ), IL-4 и IL-10 ( $r_s = 0,49$ ), IL-4 и RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,62$ ), IL-4 и IFN- $\gamma$  ( $r_s = 0,52$ ), IL-8 и IL-10 ( $r_s = 0,78$ ), IL-8 и IL-17A ( $r_s = 0,52$ ), IL-8 и RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,55$ ), IL-10 и IL-17A ( $r_s = 0,60$ ), IL-10 и RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,56$ ), IFN- $\gamma$  и RAIL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,60$ ).

Сывороточный уровень креатинина коррелировал отрицательно с мочевым уровнем креатинина ( $r_s = -0,47$ ,  $p_{rs} = 0,038$ ), а также – с сывороточными уровнями двух цитокинов – IL-2 ( $r_s = -0,54$ ,  $p_{rs} = 0,014$ ) и IL-17A ( $r_s = -0,49$ ,  $p_{rs} = 0,028$ ). Содержание в моче лишь одного цитокина – IL-2 – зависело от сывороточного уровня креатинина ( $r_s = -0,52$ ,  $p_{rs} = 0,020$ ). Мочевой уровень RAIL-1 $\beta$  был связан положительно с экскрецией креатинина с мочой ( $r_s = 0,76$ ,  $p_{rs} = 0,011$ ).

С целью нивелирования влияния состояния экскреторной функции почек на содержание цитокинов в моче была проведена нормализация уровней цитокинов по мочевому уровню креатинина. В табл. 1 представлены показатели абсолютного содержания цитокинов в утренней моче и нормализованные по креатинину значения. В этой же таблице приведены медианы и перцентильные интервалы сывороточных уровней цитокинов. При сравнении абсолютных значений уровней цитокинов в моче и сыворотке крови было установлено, что медианы содержания в моче всех изучаемых цитокинов превышают сывороточные уровни.

**Цитокины в моче у больных ПИГН.** В типичном случае диагноз ПИГН выставляли пациентам, у которых имелись такие клинические проявления, как отеки различной степени выраженности (от одутловатости лица до анасарки), повышение артериального давления, олигурия, потемнение цвета мочи, которые возникали через 1–3 недели после перенесенной стрептококковой, стафилококковой, микоплазменной или вирусной инфекции (фарингит, тонзиллит, пиодермия, острая респираторная инфекция верхних дыхательных путей и др.). Диагноз ПИГН при стертости, малосимптомности клинической картины заболевания потребовал в 60% случаев морфологического исследования, которое подтвердило наличие во всех исследованных случаях диффузного эндокапиллярного пролиферативного и/или экссудативного ГН. У всех больных ПИГН сывороточный уровень С3-компонента комплемента был ниже 0,9

г/л (референсные значения – от 0,9 до 1,8 г/л) и среднее значение в группе обследования больных составило  $0,52 \pm 0,11$  г/л. Изменения лабораторной картины мочи характеризовались гематурией (от микрогематурии до визуально выявляемой макрогематурии), протеинурией различной степени выраженности вплоть до нефротических уровней (более 3,5 г/сутки), в 1/3 случаев – цилиндрурией. В 57% случаев не было определенных клинических симптомов ГН, выявлялись лишь лабораторные признаки заболевания. Морфологическое исследование нефробиоптата во всех случаях выявляло наличие пролиферативного процесса в почечных клубочках: по типу диффузного эндокапиллярного пролиферативного ГН в 92%, эндокапиллярного экссудативного в 6% и экстракапиллярного ГН с образованием полулуний в 2%.

Абсолютные значения содержания в моче 5-и цитокинов – IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-10 и TNF- $\alpha$  – были повышены у больных в дебюте ПИГН относительно значений здоровых, в то время как абсолютные уровни IL-4, IL-17A, и IFN- $\gamma$  оказались ниже показателей здоровых (табл. 2). Нормализованные значения преобладающего числа про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-10, IL-17A и TNF- $\alpha$ ) существенно превышали соответствующие показатели здоровых лиц. Исключение составили IL-4, RAIL-1 $\beta$  и IFN- $\gamma$ , мочевые уровни которых в нормализованном выражении не отличались от значений здоровых.

При ретроспективном анализе характера клинического течения ПИГН спустя 12 месяцев после дебюта заболевания были выделены 2 группы больных – с острым ПИГН и хроническим ПИГН, сравнительное изучение мочевых уровней цитокинов которых выявило ряд различий (табл. 3). Обращало внимание то, что нормализованные значения содержания цитокинов имели более выраженные различия, нежели их абсолютные значения. Так, нормализованные уровни типичных провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-17A – у больных хроническим ПИГН оказались в дебюте заболевания ниже по сравнению с соответствующими показателями пациентов с острым течением заболевания, а уровень RAIL-1 $\beta$  – выше. В то же время уровни IL-8 и RAIL-1 $\beta$  в абсолютном выражении не реагировали на характер клинического течения заболевания и имели практически совпадающие значения при остром и хроническом течении ПИГН. Уровни IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  не различались в группах пациентов с острым и хроническим ПИГН.

У больных с хронизацией ПИГН спустя 12 месяцев после манифестации заболевания содержание в моче IL-1 $\beta$  в абсолютном и нормализованном значениях стало выше, в то время как уровень RAIL-1 $\beta$  (как в абсолютном, так и в нормализованном выражении) – ниже, чем у пациентов с благоприятным исходом – острым течением заболевания (табл. 4). Уровни IL-2 и IL-4 стали превышать у больных с хроническим течением заболевания аналогичные показатели при остром ПИГН. У больных хроническим ПИГН стали ниже показателей пациентов с острым ПИГН абсолютное и нормализованное значения IL-10, в то время как нормализованное значение IL-17A стало выше.

**Обсуждение.** В результате проведения корреляционного анализа у здоровых лиц выявлено существование прямых связей мочевых и сывороточных уровней RAIL-1 $\beta$  и IL-2. У остальных цитокинов отсутствовала корреляция сывороточных и мочевых уровней. Общее число

корреляционных связей между мочевыми уровнями цитокинов составило 14, что намного больше количества таковых между сывороточными уровнями, равного 8, что свидетельствует о более тесной связи мочевых уровней между собой, нежели сывороточных. Это, возможно, обусловлено тем, что экскретируемые с мочой цитокины образуются локально в почках и подчиняются общим закономерностям продукции цитокинов, одним из принципов которой является каскадность активации их продукции, когда одни цитокины индуцируют синтез других [5, 6]. Кроме того, существование множества корреляционных связей уровней экскретируемых с мочой цитокинов может отражать зависимость мочевых уровней цитокинов от состояния экскреторной функции почек. Однако корреляционный анализ не позволил обнаружить связь мочевых уровней большинства цитокинов с содержанием креатинина в моче, лишь абсолютное значение содержания в моче RAIL-1 $\beta$  было положительно связано с мочевым уровнем креатинина. Отсутствие связи других цитокинов с сывороточными и мочевыми уровнями креатинина можно объяснить отчасти их малыми абсолютными значениями, коротким временем существования и быстрой утилизацией в печени и почках.

Превышение у практически здоровых лиц и у больных ПИГН мочевых уровней цитокинов соответствующих сывороточных уровней также позволяет думать, что источником экскретируемых с мочой цитокинов являются почки. Это положение подтверждается данными других авторов о локальной продукции цитокинов в пораженном органе [7, 8].

Уровни экскретируемых с мочой ряда цитокинов – IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  у здоровых не превышали 2-3 пкг/мл, в то время как уровни экскреции IL-2, IFN- $\gamma$  и IL-17A в целом на порядок выше уровней первого ряда цитокинов. Максимальные значения имел уровень выделяемого с мочой противовоспалительного цитокина RAIL-1 $\beta$ . Результаты исследования Sugama K. и соавторов демонстрируют примерно такие соотношения содержания цитокинов в плазме крови и моче у спортсменов [9]. Таким образом, можно полагать, что концентрации экскретируемых с мочой цитокинов связаны с уровнями их продукции в почках.

Результаты проведенного исследования показали, что абсолютные значения цитокинов в моче могут искажать истинную картину цитокинового профиля мочи при патологии почек. Так, в группе больных ПИГН в дебюте заболевания установлено снижение относительно уровней здоровых содержания IL-4, IL-17A и IFN- $\gamma$ , что совсем не укладывается в картину активации цитокиновой сети, характерную для повреждения почек. В то же время обнаруживалось повышение нормализованных по креатинину уровней большинства про- и противовоспалительных цитокинов, что согласуется с данными других авторов о повышении уровней провоспалительных цитокинов в моче при гломерулярной патологии [4], а также – об одновременном повышении в моче содержания как про-, так и противовоспалительных цитокинов при различных формах ГН [10]. Опубликовано достаточно много работ, свидетельствующих о важной роли провоспалительных цитокинов в повреждении почечных клубочков [11-18]. Показано, что один из основных провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$  образуется гломерулярными макрофагами и мезангиальными клетками, активированными в результате взаимодей-

ствия паттерн-распознающих рецепторов (PRR) данных клеток с патоген-ассоциированными молекулярными образцами инфекционных патогенов (PAMP) или продуктами повреждения собственных тканей (DAMP). В экспериментальных условиях продуцируемый в почках IL-1 $\beta$  способствовал гломерулярному некрозу, образованию полулуний в клубочках и повреждению почечных канальцев [19]. IL-8 (хемокин CXCL-8) вызывал повышение проницаемости базальной мембраны клубочков и протеинурию у крыс за счет уменьшения синтеза протеогликанов гепарансульфата [20]. Образующийся в почках TNF- $\alpha$  инициировал повреждение подоцитов гломерул, а также активировал ренин-ангиотензиновую систему [21, 22]. IL-17A считается одним из основных провоспалительных цитокинов при ГН, продуцируется T-лимфоцитами, является хемоаттрактантом для нейтрофилов, способствует накоплению макрофагов в клубочках и блокирует супрессирующее действие Treg-клеток на аутоиммунные процессы [23–25]. Данных о прямом повреждающем действии ИЛ-2 на почки не получено, однако опубликованы положительные результаты использования в лечении больных ГН высоких доз метилпреднизолона и циклоспорина, подавляющих, как известно, выработку ИЛ-2 [26, 27]. IFN- $\gamma$  способствовал развитию оксидативного стресса, повреждению мезангиальных клеток, накоплению внеклеточного матрикса и в конечном итоге развитию нефросклероза [18, 28, 29]. IL-4 у мышей индуцировал повреждение почек и протеинурию [30]. Двум другим цитокинам – IL-10 и RAIL-1 $\beta$  – свойственны выраженные противовоспалительные и нефропротективные свойства. В ранее проведенных экспериментах введение RAIL-1 $\beta$  лабораторным животным с разными формами ГН вызывало торможение развития воспалительного процесса в почках, снижало протеинурию, восстанавливало функции почек [31, 32]. IL-10 предотвращал образование и отложение иммунных комплексов в почечных клубочках, а также препятствовал прогрессированию ГН [33–35].

Нормализованные значения цитокинов проявили как более чувствительные показатели, нежели абсолютные значения, и в ходе анализа различий в цитокиновом профиле у больных ПИГН в зависимости от характера клинического течения – острого или хронического. Так, уже в дебюте ПИГН при хроническом течении заболевания можно было отметить определенные особенности в цитокиновом профиле мочи – низкие уровни провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$ , IL-8 и IL-17A на фоне высокого уровня RAIL-1 $\beta$ . О низких уровнях IL-1 $\beta$  и IL-17A свидетельствовали как абсолютные, так и нормализованные значения содержания цитокинов в моче. Снижение уровня IL-8 и повышение уровня RAIL-1 $\beta$  обнаруживались лишь благодаря использованию нормализованных значений, так как абсолютные значения данных цитокинов не реагировали в дебюте ПИГН на характер клинического течения заболевания.

Спустя 12 месяцев наблюдения произошла инверсия характера выявленных различий в уровнях IL-1 $\beta$ , IL-17A и RAIL-1 $\beta$ : так, абсолютное и нормализованное значения исходно низкого уровня провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  стали выше при хроническом ПИГН, также стало выше нормализованное значение IL-17A, а уровень противовоспалительного цитокина RAIL-1 $\beta$  – ниже, чем у пациентов с благоприятным исходом – острым течением заболевания. Сохранение у больных ПИГН высоких уровней цитокинов с провоспалитель-

Таблица 1

Содержание цитокинов в моче и сыворотке крови у здоровых лиц (n=20)

Цитокин	Уровень в моче		Уровень в сыворотке крови
	Me (P <sub>10</sub> - P <sub>90</sub> )		Me (P <sub>10</sub> - P <sub>90</sub> )
	пг/мл	пг/мкмоль креатинина мочи	пкг/мл
IL-1β	0,02 (0,01 - 0,08)**	0,00 (0,00 - 0,01)	0,00 (0,008 - 7,00)
IL-2	10,61 (8,06 - 96,00)**	1,60 (0,65 - 6,52)	3,23 (0,58 - 17,87)
IL-4	2,39 (1,63 - 2,81)***	0,21 (0,12 - 0,53)	0,00 (0,00 - 3,95)
IL-8	0,19 (0,00 - 33,54)**	0,02 (0,00 - 3,66)	0,00 (0,00 - 4,95)
IL-10	2,99 (2,39 - 3,50)***	0,27 (0,15 - 0,57)	0,00 (0,00 - 0,50)
IL-17A	48,3 (33,6 - 71,6)***	4,55 (2,50 - 11,57)	4,08 (2,95 - 12,80)
RAIL-1β	851,8 (304,1 - 1726)**	67,5 (48,4 - 154,9)	88,97 (0,56 - 128,05)
TNF-α	1,96 (1,88 - 2,30)***	0,19 (0,11 - 0,42)	1,72 (1,62 - 1,92)
IFN-γ	13,87 (9,40 - 22,78)***	1,41 (0,75 - 2,43)	6,16 (1,30 - 10,39)

Примечание. Звездочками обозначена достоверность различия абсолютного значения уровня цитокина в моче относительно уровня в сыворотке крови: \*\* - p<sub>m-w</sub> < 0,01, \*\*\* - p<sub>m-w</sub> < 0,001.

Таблица 2

Содержание цитокинов в моче у больных ПИГН в дебюте заболевания и у здоровых лиц

Цитокины		Здоровые	Больные ПИГН	p <sub>m-w</sub> <
		n=20	n=60	
		Me (P <sub>10</sub> - P <sub>90</sub> )	Me (P <sub>10</sub> - P <sub>90</sub> )	
IL-1β	пг/мл	0,02 (0,01 - 0,08)	3,31 (0,06 - 31,99)	0,001
	норм.	0,00 (0,00 - 0,01)	0,60 (0,01 - 16,22)	0,001
IL-2	пг/мл	10,61 (8,06 - 96,00)	12,84 (11,40 - 173,70)	0,05
	норм.	1,16 (0,65 - 6,52)	3,14 (1,25 - 34,74)	0,01
IL-4	пкг/мл	2,39 (1,63 - 2,81)	1,45 (1,23 - 2,03)	0,001
	норм.	0,21 (0,12 - 0,53)	0,22 (0,11 - 3,36)	NS
IL-8	пг/мл	0,19 (0,00 - 33,54)	19,98 (0,73 - 148,50)	0,001
	норм.	0,02 (0,00 - 3,66)	3,75 (1,25 - 25,06)	0,001
IL-10	пг/мл	2,99 (2,39 - 3,50)	3,71 (2,35 - 6,78)	0,01
	норм.	0,27 (0,15 - 0,57)	0,69 (0,41 - 1,99)	0,001
IL-17A	пг/мл	48,35 (33,68 - 71,67)	36,65 (34,13 - 63,81)	0,05
	норм.	4,55 (2,50 - 11,57)	7,33 (3,14 - 36,52)	0,001
RAIL-1β	пг/мл	851,8 (304,1 - 1726)	401,2 (176,7 - 1668)	NS
	норм.	67,5 (48,4 - 154,9)	76,6 (22,3 - 289,7)	NS
TNF-α	пг/мл	1,96 (1,88 - 2,30)	2,06 (1,88 - 2,42)	0,05
	норм.	0,19 (0,11 - 0,42)	0,40 (0,18 - 1,84)	0,001
IFN-γ	пг/мл	13,87 (9,40 - 22,78)	9,53 (2,82 - 20,95)	0,01
	норм.	1,41 (0,75 - 2,43)	2,13 (0,64 - 8,25)	NS
Креатинин	мкмоль/мл	11,3 (4,6 - 19,3)	5,0 (1,0 - 11,6)	0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2-4 : норм. – нормализованное по креатинину мочи значение уровня цитокина в пг/мкмоль креатинина мочи; NS – различие не достоверно (p>0,05).

ными и нефротоксическими свойствами (IL-1β, IL-2, IL-17A и IL-4) на фоне снижения уровней противовоспалительных цитокинов – RAIL-1β и IL-10, по всей видимости, способствует хроническому течению гломерулярного повреждения.

В литературе ранее были описаны изменения содержания цитокинов в сыворотке крови у больных в дебюте и динамике ГН в зависимости от характера клинического течения заболевания [2, 36]. В частности, у детей с хроническим течением ГН было обнаружено снижение относительно показателя здоровых лиц снижение уровня RAIL-1β при неизменном значении данного показателя у пациентов с острым ГН. При этом у последних выявлялось повышение содержания в сыворотке крови уровня IL-4 при сохранении его на уровне здоровых

у пациентов с хроническим ГН. Формирование хронизации ГН ассоциировалось с повышением содержания циркулирующих в крови провоспалительных цитокинов – IL-1β, TNF-α и IL-8 при отсутствии динамики в содержании противовоспалительных цитокинов. В литературе мы не нашли данных по исследованию различий в мочевых уровнях цитокинов у больных ПИГН острого и хронического течения.

Полученные нами данные позволяют предположить, что хроническое течение ПИГН связано с исходно сниженной функциональной активностью клеток врожденного иммунитета – снижением способности продуцировать «ранний» провоспалительный цитокин – IL-1β и сопряженных с ними других провоспалительных цитокинов – IL-8 и IL-17A на фоне повышенной продук-

Таблица 3

Содержание цитокинов в моче у больных острым ПИГН и хроническим ПИГН в дебюте заболевания

Цитокины		Острый ПИГН n=30	Хронический ПИГН n=30	P <sub>м-и</sub> <
		Me (P <sub>10</sub> – P <sub>90</sub> )	Me (P <sub>10</sub> – P <sub>90</sub> )	
IL-1β	пг/мл	6,99 (0,06 - 31,99)***	0,36 (0,04 - 27,85)***	0,05
	норм.	1,19 (0,01 – 20,22) ***	0,08 (0,001 – 3,76)***	0,01
IL-2	пг/мл	12,8 (11,41 – 173,7)*	13,52 (10,41 – 4572)	NS
	норм.	2,19 (1,7 – 47,74)*	3,2 (2,1 – 55,83)**	NS
IL-4	пкг/мл	1,40 (0,86 – 3,36)**	1,56 (1,28 – 1,82)***	NS
	норм.	0,26 (0,15 – 0,62)	0,35 (0,26 – 0,74)**	NS
IL-8	пг/мл	28,85 (6,75 – 148,5) ***	11,68 (0,33 – 105,50)**	NS
	норм.	6,75 (1,7 – 34,06) ***	2,55 (0,03 – 17,67)***	0,01
IL-10	пг/мл	3,89 (1,99 – 6,24)	3,63 (2,46 – 7,58)**	NS
	норм.	0,73 (0,41 – 2,69) ***	0,81 (0,23- 2,69)***	NS
IL-17A	пг/мл	46,6 (36,47 – 62,89)**	32,63 (24,72 – 48,50)	0,05
	норм.	8,85 (7,14 – 12,52)*	7,20 (5,91 – 9,51)*	0,05
RAIL-1β	пг/мл	401,2 (259,2-943,8)*	621,90 (125,0 – 6900,0)	NS
	норм.	76,59 (22,3 – 189,7)	143,93 (29,07 – 1500,0)	0,05
TNF-α	пг/мл	2,03 (1,84 – 2,38)	2,07 (1,92 – 2,42)**	NS
	норм.	0,38 (0,34 – 0,44)**	0,47 (0,33 – 0,53)**	NS
IFN-γ	пг/мл	7,44 (2,82 – 12,93)***	12,07 (4,89 – 44,52)	NS
	норм.	1,40 (0,64 – 2,82)	2,2 (0,64 – 5,3)	NS
Креатинин	мкмоль/мл	5,4 (1,0– 9,6)	4,5 (1,0 – 10,3)	NS

Примечание. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 – различие относительно значения показателя здоровых лиц; P<sub>м-и</sub> – различие между показателями групп больных.

Таблица 4

Содержание цитокинов в моче у больных острым и хроническим ПИГН через 12 месяцев после манифестации заболевания

Цитокины		Острый ПИГН n=30	Хронический ПИГН n=30	P <sub>м-и</sub> <
		Me (P <sub>10</sub> – P <sub>90</sub> )	Me (P <sub>10</sub> – P <sub>90</sub> )	
IL-1β	пг/мл	0,06 (0,03 - 0,11)***	23,32 (0,24 - 48,49)***	0,001
	норм.	0,005 (0,001 - 0,01)	2,41 (0,02 - 4,61)***	0,001
IL-2	пг/мл	20,55 (10,61 - 31,66)	57,3 (11,2 - 204,2)**	0,05
	норм.	1,99 (1,25 - 3,31)	6,33 (2,13 - 23,81)**	0,001
IL-4	пкг/мл	1,47 (1,16 - 3,39)	2,04 (1,43 - 4,43)	0,01
	норм.	0,13 (0,11 - 0,34)	0,21 (0,13 - 0,41)	0,01
IL-8	пг/мл	39,04 (1,04 - 55,72)***	25,25 (4,88 - 53,19)***	NS
	норм.	3,51 (0,16 - 6,20)**	2,65 (0,57 - 5,63)**	NS
IL-10	пг/мл	14,57 (3,58 - 101,0)***	2,92 (2,26 - 4,39)	0,05
	норм.	1,30 (0,43 - 8,55)***	0,31 (0,21 - 0,37)	0,001
IL-17A	пг/мл	54,98 (34,51 - 75,68)	89,19 (50,8 - 124,2)	NS
	норм.	5,18 (3,51 - 8,92)	9,34 (5,5 - 16,60)*	0,01
RAIL-1β	пг/мл	1219 (804 - 2143)**	343 (221 – 1101)*	0,001
	норм.	104 (74 – 204)	35,8 (21,12 - 120,5)*	0,05
TNF-α	пг/мл	2,25 (1,07 - 2,35)	2,17 (1,89 - 2,54)*	NS
	норм.	0,22 (0,20 - 0,24)	0,23 (0,19 - 0,27)	NS
IFN-γ	пг/мл	14,06 (8,00 - 17,79)	10,26 (8,53 - 13,76)*	NS
	норм.	1,32 (0,74 - 1,75)	1,71 (0,79 - 1,88)	NS
Креатинин	мкмоль/мл	10,2 (6,3-23,5)	9,5 (5,1- 12,8)	0,05

Примечание. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 – различие относительно значения показателя здоровых лиц; P<sub>м-и</sub> – различие между показателями групп больных.

ции RAIL-1β. В результате иммунный ответ оказывается неэффективным, патоген не удаляется, и сохраняется практически на первоначальном уровне активности клеток врожденного иммунитета, продолжающих синтезировать провоспалительные цитокины IL-1β, IL-17A,

в то время как у пациентов с благоприятным исходом снижаются до уровней здоровых лиц абсолютное и нормализованное значения IL-17A, а также нормализованное значение IL-1β. Большинство исходно повышенных нормализованных уровней других цитокинов (IL-2,

TNF- $\alpha$ ) у пациентов с острым ПИГН снижалось спустя 12 месяцев после дебюта заболевания и сравнивалось со значениями группы здоровых.

**Заключение.** Итак, использование нормализованных по креатинину значений содержания цитокинов в моче расширяет возможности использования оценки цитокинового профиля мочи для установления изменений в содержании цитокинов в моче при патологии почек, а также для прогнозирования характера клинического течения ПИГН.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-35 см. REFERENCES)

2. Жизневская И.И., Хмелевская И.Г., Разинькова Н.С., Калинина З.Н. Динамика иммунологических показателей при острых и хронических гломерулонефритах у детей. *Фундаментальные исследования*. 2014; 4(2): 269-73.
36. Жизневская И.И., Хмелевская И.Г. Особенности цитокинового профиля при гломерулопатиях у детей. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. Курск, 2013; 1: 62-6.

#### REFERENCES

1. Simmons E.M., Himmelfarb J., Sezer M.T., Chertow G.M., Mehta R.L., Paganini E.P. et al. Plasma cytokine levels predict mortality in patients with acute renal failure. *Kidney Int.* 2004; 65(4): 1357-65.
2. Zhiznevskaya I.I., Khmelevskaya I.G., Razinkova N.S., Kalinina Z.N. Dynamics of immunological parameters in acute and chronic glomerulonephritis in children. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 4 (2): 269-73. (in Russian)
3. Zhang Z., Wang H., Zhang L., Crew R., Zhang N., Liu X. et al. Serum Levels of Soluble ST2 and IL-10 Are Associated with Disease Severity in Patients with IgA Nephropathy. *J. Immunol. Res.* 2016; 2016:6540937.
4. Al-Eisa A.A., Al Rushood M., Al-Attayah R.J. Urinary excretion of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 cytokines during relapse and remission of idiopathic nephrotic syndrome. *J. Inflamm. Res.* 2017; 10:1-5.
5. Beal A. L., Cerra F. B. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA*. 1994; 271(3): 226-33.
6. Suzuki K., Nakaji S., Yamada M., Totsuka M., Sato K., Sugawara K. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exerc. Immunol. Rev.* 2002; 8: 6-48.
7. Wada T., Furuichi K., Segawa-Takaeda C., Shimizu M., Sakai N., Takeda S.I. et al. MIP-1 $\alpha$  and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1999; 56(3): 995-1003.
8. Stangou M., Bantis C., Skoularopoulou M., Korelidou L., Koulokouriotou D., Scima M. et al. Th1, Th2 and Treg/T17 cytokines in two types of proliferative glomerulonephritis. *Indian J. Nephrol.* 2016; 26(3):159-66.
9. Sugama K., Suzuki K., Yoshitani K., Shiraishi K., Kometani T. Urinary excretion of cytokines versus their plasma levels after endurance exercise. *Exerc. Immunol. Rev.* 2013; 19: 29-48.
10. Kalavrizioti D., Gerolymos M., Rodi M., Kalliakmani P., Provatopoulou S., Eleftheriadis T. et al. "T helper (Th)-cytokines in the urine of patients with primary glomerulonephritis treated with immunosuppressive drugs: can they predict outcome?" *Cytokine*. 2015; 76(2): 260-9.
11. Cho B.S., Yoon S.R., Jang J.Y., Pyun K.H., Lee C.E. Upregulation of interleukin-4 and CD23/Fc epsilon RII in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 1999; 13(3): 199-204.
12. Noronha I.L., Niemi Z., Stein H., Waldherr R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1995; 10(6): 775-86.
13. Pereira Wde F., Brito-Melo G.E., Guimarras F.T., Carvalho T.G., Mateo E.C., Simxes e Silva A.C. The role of the immune system in idiopathic nephrotic syndrome: a review of clinical and experimental studies. *Inflamm. Res.* 2014; 63(1): 1-12.
14. Shao X.S., Yang X.Q., Zhao X.D., Li Q., Xie Y.Y., Wang X.G. et al. The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in

- children with primary nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2009; 24(9): 1683-90.
15. Kanai T., Yamagata T., Momoi M.Y. Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  and interleukin-8 associated with idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr. Int.* 2009; 51(4): 443-7.
16. Meng X.M., Nikolic-Paterson D.J., Lan H.Y. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* 2014; 10(9): 493-503.
17. Kurts C., Panzer U., Anders H.J., Rees A.J. The immune system and kidney disease: Basic concepts and clinical implications. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(10): 738-53.
18. Bai J., Wu L., Chen X., Wang L., Li Q., Zhang Y. et al. Suppressor of Cytokine Signaling-1/STAT1 Regulates Renal Inflammation in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis Models. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1982.
19. Lichtnekert J., Kulkarni O.P., Mulay S.R., Rupanagudi K.V., Ryu M., Allam R. et al. Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PLoS One*. 2011; 6(10): e26778.
20. Pan Q., Wu J., Tao J., Chen Y., Li L., Deng Z. et al. Role of basophils in the pathogenesis of minimal change nephrotic syndrome: a literature review. *Exp. Ther. Med.* 2014; 8(4): 1027-31.
21. Zhang J., Patel M.B., Griffiths R., Mao A., Song Y.S., Karlovich N.S. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  produced in the kidney contributes to angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*. 2014; 64(6): 1275-81.
22. Pedigo C.E., Ducasa G.M., Leclercq F., Sloan A., Mitrofanova A., Hashmi T. et al. Local TNF causes NFATc1-dependent cholesterol-mediated podocyte injury. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(9): 3336-50.
23. Velden J., Paust H.J., Hoxha E., Turner J.E., Steinmetz O.M., Wolf G. et al. Renal IL-17 expression in human ANCA-associated glomerulonephritis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2012; 302(12): 1663-73.
24. Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M., Ivanov I.I., Min R., Victora G.D. et al. TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function. *Nature*. 2008; 453(7192): 236-40.
25. Korn T., Reddy J., Gao W., Bettelli E., Awasthi A., Petersen T.R. et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat. Med.* 2007; 13(4): 423-31.
26. Shin J.I. Inverse relationship between soluble urokinase receptors and estimated glomerular filtration rate: a role for IL-2? *Kidney Int.* 2015; 87(5): 1074.
27. Shishido S., Satou H., Muramatsu M., Hamasaki Y., Ishikura K., Hataya H. et al. Combination of pulse methylprednisolone infusions with cyclosporine-based immunosuppression is safe and effective to treat recurrent focal segmental glomerulosclerosis after pediatric kidney transplantation. *Clin. Transplant.* 2013; 27(2): 143-50.
28. Hua K. F., Yang S. M., Kao T. Y., Chang J. M., Chen H. L., Tsai Y. J. et al. Osthole mitigates progressive IgA nephropathy by inhibiting reactive oxygen species generation and NF- $\kappa$ B/NLRP3 pathway. *PLoS One*. 2013; 8(10): e77794.
29. Gao J., Wei L., Liu X., Wang L., Niu D., Jin T. et al. Association Between IFN- $\gamma$  Gene Polymorphisms and IgA Nephropathy in a Chinese Han Population. *Kidney Blood Press. Res.* 2017; 42(1): 136-44.
30. Kim A.H., Chung J.J., Akilesh S., Koziell A., Jain S., Hodgin J.B. et al. B cell-derived IL-4 acts on podocytes to induce proteinuria and foot process effacement. *JCI Insight*. 2017; 2(21): e81836.
31. Lan H.Y., Nikolic-Paterson D.J., Zarama M., Vannice J.L., Atkins R.C. Suppression of experimental crescentic glomerulonephritis by the interleukin-1 receptor antagonist. *Kidney Int.* 1993; 43(2): 479-85.
32. Chen A., Sheu L.F., Chou W.Y., Tsai S.C., Chang D.M., Liang S.C. et al. Interleukin-1 receptor antagonist modulates the progression of a spontaneously occurring IgA nephropathy in mice. *Am. J. Kidney Dis.* 1997; 30(5): 693-702.
33. Yin Z., Bahtiyar G., Zhang N., Liu L., Zhu P., Robert M.E. et al. IL-10 regulates murine lupus. *J. Immunol.* 2002; 169(4): 2148-55.
34. Zhang R., Li Q., Chuang P.Y., Lu G., Liu R., Yang J. et al. Regulation of pathogenic Th17 cell differentiation by IL-10 in the development of glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 2013; 183(2): 402-12.
35. Ostmann A., Paust H.J., Panzer U., Wegscheid C., Kapffer S., Huber S. et al. Regulatory T cell-derived IL-10 ameliorates crescentic GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2013; 24(6): 930-42.
36. Zhiznevskaya I.I., Khmelevskaya I.G. Features of cytokine profile in children with glomerulopathy. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik Chelovek i ego zdorov'e*. 2013; 1: 62-6. (in Russian)

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Абаев И. В., Скрябин Ю. П., Коробова О. В., Полосенко О. В., Шепелин А. П.

### СРАВНЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ГЕНОВ ГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Оболенск, Россия

*Проводили тестирование клинических штаммов Staphylococcus aureus на гемолитическую активность на кровяном агаре, в ПЦР тесте и посредством анализа аллелей генов гемолитических токсинов. В работе анализировали информативность фенотипического определения гемолитической активности для оценки патогенных свойств изолятов S. aureus.*

**Ключевые слова:** *Staphylococcus aureus*; гемолитические токсины; бактериальный геном; генотип.

**Для цитирования:** Абаев И. В., Скрябин Ю. П., Коробова О. В., Полосенко О. В., Шепелин А. П. Сравнение гемолитической активности и генов гемолитических токсинов клинических штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных на территории РФ. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5): 294-298. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-294-298>

*Abaev I. V., Skryabin Y. P., Korobova O. V., Polosenko O. V., Shepelin A. P.*

COMPARISON OF HEMOLYTIC ACTIVITY AND HEMOLYTIC TOXIN GENES OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CLINICAL STRAINS, ISOLATED IN RUSSIA

FBIS «State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology» of the Rosпотребнадзор, 142279, Obolensk, Russia

*Clinical strains of Staphylococcus aureus were tested for hemolytic activity on blood agar, in the PCR test and by analyzing the gene alleles of hemolytic toxins. The study analyzed the information content of the phenotypic determination of hemolytic activity to assess the pathogenic properties of S. aureus isolates.*

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; Hemolysin Proteins; Bacterial Genome; Genotype.

**For citation:** *Abaev I. V., Skryabin Y. P., Korobova O. V., Polosenko O. V., Shepelin A. P. Comparison of hemolytic activity and hemolytic toxin genes of Staphylococcus aureus clinical strains, isolated in Russia. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (5): 294-298 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-294-298>*

**For correspondence:** *Abaev I.V.*, PhD, leading researcher; e-mail: [abaev@obolensk.org](mailto:abaev@obolensk.org)

#### Information about authors:

*Abaev I.V.*, <http://orcid.org/0000-0003-2724-557X>  
*Skryabin Y.P.*, <http://orcid.org/0000-0001-5748-995X>  
*Korobova O.V.*, <http://orcid.org/0000-0002-7068-3236>  
*Polosenko O.V.*, <http://orcid.org/0000-0001-5961-9041>  
*Shepelin A.P.*, <http://orcid.org/0000-0002-8253-7527>

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

**Acknowledgment.** *This work was supported by Rosпотребнадзор research projects*

Received 28.03.2019  
Accepted 05.04.2019

**Введение.** *Staphylococcus aureus* относится к наиболее распространённым и актуальным бактериальным патогенам человека и вызывает широкий спектр инфекционных заболеваний: от поверхностных инфекций кожи до такой патологии, как пневмония, бактериемия, остеомиелит, эндокардит, токсический шок и др. [1]. Разнообразие клинических синдромов инфекций *S. aureus* тесно коррелирует с большим числом различных экзопродуктов с выраженными токсиче-

скими свойствами. Среди них выделяют группу гемолитических токсинов: альфа-, бета-, гамма- и дельта-токсины, проявляющих цитолитическое действие в отношении различных типов клеток организма хозяина [2]. Гемолизины стафилококков различаются биохимическими и антигенными свойствами, литической активностью по отношению к эритроцитам различных видов животных.

Наибольшее значение имеет порообразующий альфа-токсин, который известен как один из основных факторов вирулентности *S. aureus*. Альфа-токсин ассоциируется с тяжёлыми стафилококковыми инфекциями: пневмонией, сепсисом, септическим артритом, абсцессом головного мозга и др. Альфа-токсин вызывает лизис эритроцитов и моноцитов,

**Для корреспонденции:** *Абаев Игорь Валентинович*, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. антимикробных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ; e-mail: [abaev@obolensk.org](mailto:abaev@obolensk.org)

индуцирует продукцию целой группы цитокинов и хемокинов, демонстрирует высокую гемолитическую активность против бараньих и кроличьих эритроцитов. Токсин с молекулярной массой в 33 кДа кодируется геном *hla*, локализованным в хромосоме *S. aureus* [3]. Несмотря на то что ген *hla* представлен в геномах практически всех штаммов *S. aureus*, более 10% штаммов не продуцируют альфа-токсин [4]. Бета-токсин, сфингомиелиназа С, с молекулярной массой 35 кДа, известен как гемолитический фермент, обладающий токсичностью для пролиферирующих лимфоцитов человека и цитотоксической активностью против основных клеточных компонентов кожи человека, в том числе, против кератиноцитов [5]. Бета-токсин вызывает нарушение проницаемости сосудистой стенки и демонстрирует высокую гемолитическую активность против бараньих, но не кроличьих эритроцитов. Гемолитическая активность бета-токсина усиливается при температуре инкубации ниже 10° С. Продукция бета-токсина ассоциируется с инфекциями лёгких и роговицы глаза человека. Показана способность бета-токсина ингибировать двигательную активность ресничек мерцательного эпителия полости носа [6]. Бета-токсин кодируется хромосомным геном *hlb* [7]. Гамма-токсин, двухкомпонентный цитоллизин, имеет молекулярную массу от 32 до 34 кДа, кодируется генами *hlgA*, *hlgC*, *hlgB*, продуцируется более чем 99% штаммов *S. aureus*. Гамма-токсин разрушает нейтрофилы, макрофаги, эритроциты [8]. Дельта-токсин с молекулярной массой 2,9 кДа, кодируется геном *hld*, способен вызывать повреждение мембраны различных типов клеток человека и животных. Этот белок продуцируется более чем 97% штаммов *S. aureus* [9]. Роль гамма- и дельта-токсинов в патогенезе стафилококковых инфекций остается неясной. Связь альфа- и бета-токсинов с вирулентными свойствами *S. aureus* можно считать установленной, в отличие от гамма- и дельта-токсинов.

В противоположность большинству токсинов *S. aureus*, продукция гемолитических токсинов определяется с помощью простого фенотипического теста. Тест гемолитической активности *S. aureus* проводят на 5% кровяном агаре, где выявляют колонии, окружённые зоной гемолиза. При проведении фенотипического теста на кровяном агаре выявляют активность двух гемолизин: альфа- и бета-токсинов [8]. Действие альфа-гемолизина характеризуется узкой зоной полного лизиса, т. н. бета-гемолиз, причём ширина зоны лизиса варьирует в зависимости от штамма и зависит от регуляторных систем *S. aureus*, контролирующих продукцию токсина. Для бета-гемолизина показана широкая зона неполного лизиса, т. н. альфа-гемолиз. Определение гемолитической активности *S. aureus* включено в классические методы характеристики изолятов *S. aureus*. Согласно ГОСТу, наличие гемолитической активности подтверждает энтеротоксигенные свойства *S. aureus*<sup>1</sup>. В публикациях отечественных авторов тест на гемолитическую активность используется для дифференциации штаммов *S. aureus* по признаку вирулентности [10].

Коллекция штаммов *S. aureus* ГНЦ ПМБ состоит из вне- и внутригоспитальных штаммов *S. aureus*, изолированных в РФ, включает референс-штаммы *S. aureus* из Американской коллекции типовых культур. Штаммы коллекции охарактеризованы различными методами, включая клиническую информацию, данные полногеномного исследования, исследования на лабораторных животных. В рамках описания свойств штаммов *S. aureus* проводятся фенотипические тесты, отражающие различную биохимическую активность *S. aureus*.

Результаты фенотипических тестов в дальнейшем анализируются с учётом клинических данных и генетической характеристики штаммов. Все штаммы *S. aureus*, использованные в исследовании, изолированы при инвазивных инфекциях, инфекциях кожи, пищевых токсикоинфекциях.

Целью исследования являлся сравнительный анализ параметров формирования зоны гемолиза на кровяном агаре и генетической структуры штаммов *S. aureus*, выделенных в последние годы при вспышках стафилококковых инфекций в РФ. Изучение гемолитических свойств таких штаммов с помощью фенотипических, генетических, биоинформационных методов направлено на получение новой информации о вирулентных штаммах *S. aureus*, циркулирующих в РФ.

**Материал и методы.** В работе использовали семь штаммов *S. aureus*, изолированных при расследовании стафилококковых вспышек в РФ, три референсных штамма *S. aureus* из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC) (табл. 1). Полногеномные последовательности всех штаммов *S. aureus* представлены в базе данных GenBank [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>].

Определение гемолитической активности проводили на четырёх питательных средах производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск: мясо-пептонный агар (МПА), триптон-соевый агар (ТСА), питательный агар для культивирования микроорганизмов (ГРМ-агар), питательная среда для количественного определения микробной загрязнённости (среда № 1 ГРМ), все с добавлением 5% бараньей крови. При фенотипическом анализе на гемолитическую активность результаты учитывали дважды: через 48 ч инкубации при 37° С и после дополнительной инкубации в течение 24 ч при 10° С. Оценку гемолитической активности проводили по диаметру зоны гемолиза и степени просветления в зоне гемолиза. Штамм *S. aureus* ATCC 10832 (Wood 46) [11] использован для контроля кровяного агара в тесте на гемолитическую активность. По паспорту штамм формирует белые эмалевидные колонии диаметром 3 мм с обширной зоной полного просветления среды вокруг каждой колонии. Данный тип гемолиза определяется как результат продукции альфа-токсина.

ПЦР анализ на наличие генов *hla* и *hlb* в геномах исследуемых штаммов проведён с использованием олигонуклеотидных праймеров: *hla*-F, 5'-GAAGTCTGGTGAACCCCTGA-3'; *hla*-R, 5'-TGAATCCTGTCGCTAATGCC-3', и *hlb*-F, 5'-CAATAGTGCCAAAGCCGAAT-3'; *hlb*-R, 5'-TCCAGCACCACAACGAGAAT-3' [12]. Для проведения мультилокусного сиквенс-типирования по генам домашнего хозяйства геномных последовательностей использован онлайн инструмент на сервере Центра геномных исследований [[cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/](http://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/)]. Определение локализации генов *hla* и *hlb* в полногеномных последовательностях исследуемых штаммов проведено с использованием программы NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для сравнения и анализа транслированных последовательностей генов *hla* и *hlb* использована программа MEGA-X ([www.megasoftware.net/](http://www.megasoftware.net/)). В качестве референсных последовательностей для анализа использованы следующие последовательности *S. aureus*: для гена *hla* – геном штамма Mu50 (GenBank BA000017), для гена *hlb* – геном штамма O46 (GenBank CP025395); для оперона *hlg* (гены *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*) и гена *hld* – геном штамма MRSA252 (GenBank BX571856).

**Результаты.** При проведении фенотипического теста на гемолитическую активность для десяти штаммов *S. aureus* (см. табл. 1) определено четыре варианта гемолиза: А – зона гемолиза не определяется; В – узкая зона гемолиза с полным лизисом (бета-гемолиз); С – широкая зона гемолиза с полным лизисом (бета-гемолиз); D – двойная широкая зона гемолиза, которая состоит из зоны полного гемолиза, аналогичного варианту В и дополнительная широкая зона с не-

<sup>1</sup>ГОСТ 31746-2012 Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества коагулазоположительных стафилококков и *Staphylococcus aureus*.

Штаммы *S. aureus*, использованные в работе

	Название штамма	Инфекция, место и год выделения	Генотип	Ссылки
1	ATCC BAA-1707 MW2	внегоспитальная инфекция, США, 1998	CC1, MRSA	[13]
2	ATCC BAA-1720 MRSA252	внутригоспитальная инфекция, Великобритания, 1997	CC30, MRSA	[14]
3	ATCC 700699 Mu50	внутригоспитальная инфекция, Япония, 1997	CC5, MRSA	[13]
4	ГКПМ-Оболensk В-6838	внутригоспитальная инфекция, РФ, 2007	CC239, MRSA	данная публикация
5	ГКПМ-Оболensk В-7438	острая кишечная инфекция, РФ, 2013	CC30, MSSA	[15, 16]
6	ГКПМ-Оболensk В-7778	острая кишечная инфекция, РФ, 2014	CC30, MSSA	[15, 16]
7	ГКПМ-Оболensk В-7774	эксфолиативный дерматит новорожденных, РФ, 2013	CC15, MSSA	[17]
8	ГКПМ-Оболensk В-7803	эксфолиативный дерматит новорожденных, РФ, 2015	CC121, MSSA	данная публикация
9	ГКПМ-Оболensk В-7904	острая кишечная инфекция, РФ, 2015	CC1, MSSA	[17]
10	ГКПМ-Оболensk В-7905	острая кишечная инфекция, РФ, 2015	CC1, MSSA	[17]

Примечание. CC – клональный комплекс (clonal complex); MRSA – метициллинрезистентные штаммы *S. aureus*; MSSA – метициллинчувствительные штаммы *S. aureus*.

Таблица 2

Гемолитическая активность и анализ генов *hla* и *hnb* штаммов *S. aureus*

Штамм <i>S. aureus</i>	Вариант гемолиза	Определение генов <i>hla</i> и <i>hnb</i> методом ПЦР		Анализ нуклеотидной последовательности генов <i>hla</i> и <i>hnb</i>	
		<i>hla</i>	<i>hnb</i>	<i>hla</i>	<i>hnb</i>
Mu50	(A)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> *	phiSa3
MRSA252	(A)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> (TAG)	phiSa3
MW2	(B)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> *	phiSa3
В-6838	(B)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> *	phiSa3
В-7438	(A)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> (TAG)	phiSa3
В-7778	(A)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> (TAG)	phiSa3
В-7774	(C)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (+)	<i>hla</i> *	<i>hnb</i> *
В-7803	(C)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> *	phiSa3
В-7904	(B)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (-)	<i>hla</i> *	phiSa3
В-7905	(D)	<i>hla</i> (+)	<i>hnb</i> (+)	<i>hla</i> *	<i>hnb</i> *

Примечание. (A) – гемолиз отсутствует; (B) – тонкий ареал гемолиза с полным лизисом; (C) – широкий ареал гемолиза с полным лизисом; (D) – двойной широкий ареал гемолиза; *hla* (+)/(-) – ген альфа-гемолизина определяется/не определяется в ПЦР; *hnb* (+)/(-) – ген бета-гемолизина определяется/не определяется в ПЦР; *hla*\* – интактная последовательность гена *hla*; *hla* (TAG) – последовательность гена *hla* со стоп-кодоном; *hnb*\* – интактная последовательность гена *hnb*; phiSa3 – инсерция профага phiSa3-типа в последовательность гена *hnb*.

полным гемолизом (двойная зона альфа- и бета-гемолиза) (табл. 2, рис. 1, см. обложку). Указанные варианты гемолиза воспроизводились на всех четырех использованных в работе средах. Визуально гемолиз наиболее выражен на среде МПА (рис. 2, см. обложку). После дополнительной инкубации в течение 24 ч при 10° С на среде МПА у штаммов *S. aureus* с вариантом гемолиза А появились участки со слабым проявлением неполного гемолиза зеленоватого цвета (см. рис. 1, А.). Зона полного гемолиза (варианты гемолиза В и С) формируется вследствие продукции альфа токсина [18]. Контрольный штамм *S. aureus* ATCC 10832 (Wood 46), продуцент альфа токсина, в нашем эксперименте формирует зону гемолиза идентичную варианту С (рис. 3, см. обложку). Широкая зона неполного лизиса (вариант D) характерна для штаммов *S. aureus*, продуцирующих бета-токсин. Инкубация посевов при 10° С не изменила характера дополнительной широкой зоны неполного лизиса в варианте D.

Методом ПЦР определено наличие генов гемолизинов *hla* и *hnb* в геноме штаммов *S. aureus*. Для всех штаммов *S. aureus*

в ПЦР со специфическими олигонуклеотидными праймерами на ген *hla* выявлены ампликоны с ожидаемым размером 704 п.о., что свидетельствует о представленности последовательности гена *hla* в геномах исследуемых штаммов *S. aureus*. ПЦР-тест на наличие гена *hnb* отрицательный для 8 из 10 штаммов *S. aureus* (см. табл. 2). Для сравнения последовательностей генов гемолизинов, гены альфа-, бета-, гамма- и дельта-токсинов, идентифицированы с помощью программы NCBI BLAST в полногеномных последовательностях штаммов *S. aureus*. Последовательности гена *hla* сравнивали с последовательностью гена *hla* из штамма Mu50 (960 п.о., 319 а.о.). Всего выявлено пять вариантов аминокислотной последовательности гена *hla* для десяти исследованных штаммов *S. aureus* (табл. 3). Для семи штаммов *S. aureus*, которые относятся к клональным комплексам 1, 5, 15, 239, 121, последовательность гена *hla* при сравнении с последовательностью гена *hla* из штамма Mu50 имеет более 99% идентичности. Последовательность гена *hla* трёх штаммов *S. aureus*, относящихся к CC30, показала 95% идентичности по отношению к гену *hla* из штамма Mu50, что составляет 50 единичных нуклеотидных замен. Большая часть замен относится к синонимичным. Число несинонимичных замен равно четырём, одна из этих замен ведёт к нонсенс-мутации в позиции 113 транслированной последовательности гена *hla* (см. табл. 3). В регионах геномов восьми штаммов *S. aureus*, показавших отрицательные результаты в ПЦР на наличие гена *hnb*, выявлена инсерция профага phiSa3-типа в ген *hnb* (см. табл. 2). Два штамма *S. aureus* CC1 В-7905 и *S. aureus* CC15 В-7774 несут интактную последовательность гена *hnb*, идентичную последовательности гена *hnb* из генома штамма O46. Последовательности генов гамма- и дельта-токсинов проанализированы для геномов штаммов *S. aureus* с гемолизом типа А: Mu50, MRSA252, В-7438, В-7778. Последовательность гена дельта-токсина (138 п.о., 45 а.о.) обладает высокой консервативностью. Для всех четырех штаммов с гемолизом типа А гены дельта-токсина идентичны. Размер оперона гамма-токсина в геноме штамма *S. aureus* MRSA252 составляет 3405 п.о., включает гены *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*. Геномы штаммов *S. aureus* CC30 В-7438 и В-7778 содержат идентичные последовательности оперона *hlg*, которые отличаются от последовательности *S. aureus* CC30 MRSA252 на один нуклеотид (несинонимичная замена). Идентичность нуклеотидной последовательности оперона *hlg* штаммов *S. aureus* CC5 Mu50 и *S. aureus* CC30 MRSA252 составляет 95%, при этом выявлено большое число несинонимичных замен.

**Обсуждение.** Простая и быстрая оценка вирулентности *S. aureus* при анализе эпидемического потенциала изолятов, выделенных во время расследования вспышек стафилокок-

Таблица 3  
Сравнение транскрипированной последовательности гена *hla* штаммов *S. aureus*

Штамм / Кло-нальный тип	Вариабельные аминокислоты с номером позиции								Тип ге-молиза
	R4	I40	L78	Q113	T155	E234	S265	T301	
Mu50/CC5	.	.	.	.	.	.	.	.	A
B-7774/CC15	.	.	.	.	.	.	.	.	C
B-7904/CC1	.	F	.	.	.	D	.	.	B
B-7905/CC1	.	F	.	.	.	D	.	.	D
MW2/CC1	.	.	.	.	.	D	.	.	B
B-6838/CC239	H	.	.	.	.	D	.	I	B
B-7803/CC121	.	.	.	.	.	D	.	.	C
B-7438/CC30	.	.	I	*	S	.	T	.	A
B-7778/CC30	.	.	I	*	S	.	T	.	A
MRSA252/ CC30	.	.	I	*	S	.	T	.	A

ковой инфекции, является высоко востребованной. Использование фенотипического теста для оценки выглядит привлекательно, тем более, что существует достаточное количество данных, свидетельствующих о гемолизинах А и В, как факторах вирулентности *S. aureus*. Роль альфа-токсина в развитии лёгочной стафилококковой инфекции показана на мышинной модели гнойно-некротической пневмонии [19]. Фенотипический тест с определением активности альфа-токсина *S. aureus* по гемолизу на кровяном агаре предлагается использовать для прогноза развития такого заболевания, как вентилятор-ассоциированная пневмония [18]. Выявлена сложная система регуляции продукции альфа- и бета-токсинов, в которую вовлечены не менее 70 генов, влияющих на повышение или понижение экспрессии генов гемолизинов, вплоть до отсутствия таковой [2].

Различные клональные линии *S. aureus* могут иметь сильно отличающиеся уровни продукции токсинов, что, влияет на выраженность вирулентных свойств штаммов *S. aureus*. Использование в тестах неродственных клональных линий *S. aureus* следует признать необходимым условием для сравнительного исследования гемолитической активности и геномной структуры. В исследование включены клинические штаммы шести эпидемически значимых клональных комплексов *S. aureus*, ответственных за развитие широкого спектра инфекций. Вирулентность использованных в работе штаммов *S. aureus* подтверждается тем, что они являются возбудителями стафилококковых инфекций. Три известных референсных штамма MRSA из коллекции ATCC изолированы в Японии, Великобритании, США при тяжёлых инфекциях *S. aureus*, причём MRSA252 и MW2 выделены при септицемии, закончившейся смертью пациентов. Эти штаммы принадлежат к CC1, CC5, CC30. Семь штаммов *S. aureus* из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболensk) ГНЦ ПМБ изолированы при вспышках стафилококковых инфекций в РФ (см. табл. 1). В их число входят штаммы *S. aureus* CC1 и CC30, выделенные во время острых кишечных инфекций, штаммы MSSA CC15 и CC121, изолированные при вспышках эксфолиативного дерматита новорожденных, штамм MRSA CC239, выделенный при госпитальной инфекции.

На первом этапе исследования проведено определение гемолитической активности на кровяном агаре с подтверждением результатов гемолиза в ПЦР-тесте. В гемолитическом тесте у четырех штаммов *S. aureus* CC5 и CC30 отсутствовал гемолиз. Пять штаммов *S. aureus*, принадлежащих к CC1, CC15, CC121, CC239, продемонстрировали бета-гемолиз (зо-

на гемолиза с полным лизисом). Один штамм *S. aureus* CC1 показал двойную зону гемолиза – альфа- и бета-гемолиз (зона бета-гемолиза дополнена широкой зоной неполного лизиса). Результаты ПЦР-теста не совпали с данными гемолитического теста. Для всех десяти штаммов *S. aureus* ПЦР-тест на ген *hla* оказался позитивным, а наличие гена *hnb* методом ПЦР выявлено только для двух штаммов *S. aureus* CC1 B-7905 и *S. aureus* CC15 B-7774 (см. табл. 2).

Сравнение последовательностей генов гемолизинов штаммов *S. aureus* позволило существенно прояснить наблюдаемую картину. Наибольший интерес для дальнейшего исследования представляли штаммы *S. aureus*, гемолиз у которых отсутствовал. Это штаммы *S. aureus* CC5 Mu50 и CC30 MRSA252, выделенные при тяжёлых внутрибольничных инфекциях, штаммы *S. aureus* CC30 B-7438 и CC30 B-7778, выделенные при массовых вспышках пищевой токсикоинфекции. Для штаммов *S. aureus* MRSA252, B-7438 и B-7778, установлено, что отсутствие гемолиза и отсутствие продукции альфа-токсина, связано с нонсенс-мутацией в гене *hla*. Такая мутация не может быть компенсирована каким-либо механизмом регуляции, что свидетельствует о том, что реализация вирулентных свойств этих штаммов не нуждается в альфа-токсине. Ген *hla* штамма *S. aureus* CC5 Mu50 не содержит в структурной части гена мутаций, препятствующих продукции токсина. Можно предположить, что отсутствие продукции альфа-токсина штаммом *S. aureus* CC5 Mu50 связано с негативной регуляцией. Отсутствие продукции бета-токсина в гемолитическом тесте для этих четырёх штаммов *S. aureus* объясняется инактивацией гена *hnb* при inserции бактериофагом phiSa3-типа.

Штаммы *S. aureus* с подтверждённой продукцией альфа-токсина и отсутствием продукции бета-токсина, разделились на две группы по ширине зоны бета-гемолиза. Штаммы *S. aureus* с узкой зоной полного лизиса принадлежат к CC1 и CC239, изолированы при внутрибольничных инфекциях и пищевых токсикоинфекциях. Более широкая зона полного лизиса выявлена у штаммов *S. aureus* CC15 и CC121, выделенных при эксфолиативном дерматите новорожденных. В данном случае правомерно предположить, что различие в ширине зоны бета-гемолиза связано с клональным типом, что объясняется различиями в системе регуляции продукции альфа-токсина. В отношении продукции бета-токсина, полученные результаты коррелируют с данными литературы. У большинства клинических изолятов *S. aureus* ген *hnb* содержит вставку профага phiSa3 типа, что ведёт к негативной фаговой конверсии бета-токсина [20]. Inserция в ген *hnb* делает невозможным продукцию бета-токсина. На этой основе сделано предположение, что штаммы *S. aureus* определённых клональных линий не нуждаются в бета-токсине при развитии инвазивных инфекций человека. У девяти исследованных штаммов *S. aureus* активность бета-токсина в гемолитическом тесте отсутствовала. Из них восемь штаммов *S. aureus* содержат вставку профага phiSa3-типа, один штамм *S. aureus* CC15 B-7774 имеет интактный ген *hnb*, что, соответственно, позволяет допустить возможность негативной регуляции продукции токсина. Два штамма *S. aureus* CC1 B-7904 и B-7905, выделенные при вспышке пищевой токсикоинфекции, имеют идентичные геномы, за исключением гена *hnb*. Штамм *S. aureus* CC1 B-7904 имеет inserцию гена *hnb* профагом phiSa3-типа, что является его единственным отличием от штамма *S. aureus* CC1 B-7905 на уровне генома. Единственный из исследованных штаммов *S. aureus* B-7905 продуцирует альфа- и бета-токсины, что выражается в двойной зоне гемолиза – узкая зона полного лизиса и широкая зона неполного лизиса (см. рис. 1, D). Штамм *S. aureus* B-7904 с

негативной фаговой конверсией не продуцирует бета-токсин и демонстрирует узкую зону полного лизиса (см. рис 1, В). В данном случае, постановка гемолитического теста визуализирует акт генетической перестройки генома.

По данным гемолитического теста из 10 клинических штаммов *S. aureus*, девять не продуцируют бета-токсин и, четыре из них, не продуцируют и альфа-токсин. Штаммы *S. aureus* с инсерцией гена *hlyB* имеют более сложную регуляцию продукции бета-токсина в процессе развития инфекции, чем следует из гемолитического теста. Для референсного вирулентного штамма *S. aureus* MW2 продемонстрирована высокая частота точной эксцизии бактериофага phiSa3 из хромосомы в условиях *in vivo*, но не *in vitro* [5]. При эксцизии фага phiSa3 продукция бета-токсина восстанавливалась, что позволило штамму *S. aureus* MW2 в эксперименте успешно колонизировать кожу экспериментальных животных. Часть популяции *S. aureus* с инсерцией гена *hlyB* при инфекции может продуцировать токсин. Насколько данный механизм является распространённым среди штаммов *S. aureus* с интеграцией профага в гене *hlyB* неизвестно.

У штаммов *S. aureus* MRSA252, B-7438 и B-7778, показавших отрицательный результат в тесте на гемолиз, после дополнительной инкубации при 10° С появились участки со слабым проявлением неполного гемолиза зеленоватого цвета (см. рис. 1, А). Возможно, в данном случае наблюдается случай спонтанной продукции бета-гемолизина частью популяции, либо частичный гемолиз связан с продукцией гамма- или дельта-токсинов.

**Заключение.** Сопоставление информации о вирулентности штаммов *S. aureus* и результатов фенотипического определения гемолитической активности не подтверждают возможности оценки вирулентности изолятов *S. aureus* по продукции альфа- и бета-гемолизинов *in vitro*. У части вирулентных штаммов *S. aureus*, использованных в исследовании, отсутствует гемолиз в тесте на гемолитическую активность. Фенотипическое определение гемолиза на поверхности питательной среды может не соответствовать реальной продукции токсина при развитии инфекционного процесса. Исследования продукции гемолизинов *in vitro* недостаточно информативны для определения клинической роли штаммов *S. aureus*.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы Роспотребнадзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–9, 11–14, 16–20 см. REFERENCES)

10. Граничная Н.В., Зайцева Е.А., Бондарь В.Ю. Фенотипическая характеристика биологических свойств коагулазонегативных стафилококков, выделенных в кардиохирургическом стационаре. *Альманах клинической медицины*. 2017; 45 (2): 127-32.
15. Абаев И.В., Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Мицевич И.П., Мухина Т.Н. и др. Геномный анализ штаммов *Staphylococcus aureus* клональной линии 30 — возбудителей пищевой инфекции в Российской Федерации. *Вестник РАМН*. 2017; 72 (5): 346-54.

## REFERENCES

1. Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339 (8): 520-32.
2. Burnside K., Lembo A., de Los Reyes M., Pliuk A., Binhtran N.T., Connelly J.E. et al. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. *PLoS One*. 2010; 5 (6): e11071.
3. Bubeck Wardenburg J., Patel R.J., Schneewind O. Surface proteins

- and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect. Immun.* 2007; 75 (2): 1040-4.
4. Sharma-Kuinkel B.K., Wu Y., Tabor D.E., Mok H., Sellman B.R., Jenkins A. et al. Characterization of alpha-toxin hly gene variants, alpha-toxin expression levels, and levels of antibody to alpha-toxin in hemodialysis and postsurgical patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53 (1): 227-36.
5. Katayama Y., Baba T., Sekine M., Fukuda M., Hiramatsu K. Beta-hemolysin promotes skin colonization by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2013; 195 (6): 1194-203.
6. Hayashida A., Bartlett A.H., Foster T.J., Park P.W. *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. *Am. J. Pathol.* 2009; 174 (2): 509-18.
7. Carroll J.D., Cafferkey M.T., Coleman D.C. Serotype F double- and triple-converting phage insertionally inactivate the *Staphylococcus aureus* beta-toxin determinant by a common molecular mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993; 106 (2): 147-55.
8. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13 (1): 16-34.
9. Peng H.L., Novick R.P., Kreiswirth B., Kornblum J., Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 1988; 170 (9): 4365-72.
10. Granichnaya N.V., Zaitseva E.A., Bondar V.Y. Phenotypic characterization of the biological properties of coagulase-negative staphylococci isolated in a cardiac surgery department. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2017; 45 (2): 127-32. (in Russian)
11. Vandana S., Raje M., Krishnasastry M.V. The role of the amino terminus in the kinetics and assembly of alpha-hemolysin of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 1973; 272 (40): 24858-63.
12. Fei Y., Hongjun Y., Hong-Bin H., Changfa W., Yundong G., Qifeng Z. et al. Study on haemolysin phenotype and the genotype distribution of *Staphylococcus aureus* caused bovine mastitis in Shandong dairy farms. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 2011; 9 (4): 416-421.
13. Baba T., Takeuchi F., Kuroda M., Yuzawa H., Aoki K., Oguchi A. et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*. 2002; 359 (9320): 1819-27.
14. Holden M.T., Feil E.J., Lindsay J.A. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101 (26): 9786-91.
15. Aбаев И.В., Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Мицевич И.П., Мухина Т.Н. et al. Genomic analysis of food-borne *Staphylococcus aureus* CC30 strains in the Russian Federation. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2017; 72 (5): 346-54. (in Russian)
16. Aбаев И., Скрябин Ю., Кисличкина А., Богун А., Коробова О., Dyatlov I. Draft Genome Sequences of Eight *Staphylococcus aureus* Strains Isolated during Foodborne Outbreaks. *Genome Announc.* 2018; 6 (5): e01557-17.
17. Aбаев И., Скрябин Ю., Кисличкина А., Богун А., Коробова О., Mayskaya N. et al. Draft Genome Sequences of Exfoliative Toxin A-Producing *Staphylococcus aureus* Strains B-7772 and B-7777 (CC8/ST2993) and B-7774 (CC15/ST2126), Isolated in a Maternity Hospital in the Central Federal District of Russia. *Genome Announc.* 2016; 4 (2): e00064-16.
18. Stulik L., Malafa S., Hudcova J., Rouha H., Henics B.Z., Craven D.E. et al.  $\alpha$ -Hemolysin activity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* predicts ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014; 190 (10): 1139-48.
19. Keibaer C., Chamberland R.R., Allen I.C., Gao X., Broglie P.M., Hall J.D. et al. *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. *J. Infect. Dis.* 2012; 205 (5): 807-17.
20. Lowder B.V., Guinane C.M., Ben Zakour N.L., Weinert L.A., Conway-Morris A., Cartwright R.A. et al. Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106 (46): 19545-50.

Поступила 28.03.19

Принята к печати 05.04.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Фурсов М. В., Дятлов И. А., Потапов В. Д.

## МОДЕЛИ ПОКОЯЩЕГОСЯ СОСТОЯНИЯ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN VITRO И ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ IN VIVO

ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,  
142279, Оболенск, Московская обл., Россия

*Моделирование латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ) осуществляется в целях выяснения аспектов туберкулезного патогенеза, а также тестирования новых лекарственных противотуберкулезных препаратов. В настоящем обзоре дана характеристика in vitro-моделей (n=16) покоящегося состояния Mycobacterium tuberculosis и in vivo-моделей (n=14) получения латентной туберкулезной инфекции на разных видах животных, опубликованных в отечественной и зарубежной научной литературе к настоящему времени. Представлено краткое описание модели и полученные авторами основные результаты. Анализ литературных данных отображает спектр методических приемов, позволяющих исследователям изучать механизм перехода клеток M. tuberculosis в покоящееся состояние и выхода из него, а также процессы перехода активной туберкулезной инфекции в латентную форму и ее реактивации.*

**Ключевые слова:** туберкулез; латентная туберкулезная инфекция; ЛТБИ; Mycobacterium tuberculosis; модели in vitro; модели in vivo; обзор.

**Для цитирования:** Фурсов М. В., Дятлов И. А., Потапов В. Д. Модели покоящегося состояния Mycobacterium tuberculosis in vitro и латентной туберкулезной инфекции in vivo. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5): 299-307. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-299-307>

Fursov M.V., Dyatlov I.A., Potapov V.D.

### IN VITRO MODELS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS DORMANCY, AND IN VIVO MODELS OF LATENT TUBERCULOSIS INFECTION

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, 142279, Obolensk, Moscow Region, Russia

*Modeling of tuberculosis infection is carried out in order to clarify various aspects of the tuberculosis pathogenesis, as well as the testing of new anti-tuberculosis drugs. The characteristic of in vitro models (n = 16) for Mycobacterium tuberculosis dormant state and in vivo models (n = 14) for the latent tuberculosis infection involving several animal species published to date are presented in this review. A brief description of the models and the results obtained by the authors are presented. The analysis of the published data reflects the list of methodological procedures that allow researchers to study the mechanism of the transition of M. tuberculosis cells to a dormant state and reverse to metabolically active state, as well as the process of conversion of active tuberculosis infection to a latent tuberculosis and reactivation.*

**Key words:** tuberculosis; latent tuberculosis infection; LTBI; Mycobacterium tuberculosis; models in vitro; models in vivo; review.

**For citation:** Fursov M.V., Dyatlov I.A., Potapov V.D. In vitro models of Mycobacterium tuberculosis dormancy, and in vivo models of latent tuberculosis infection. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (5): 299-307 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-299-307>

**For correspondence:** Fursov M.V., researcher of the Department for Training and Improvement of Specialists; e-mail: mikhail.fursov88@gmail.com

#### Information about authors:

Fursov M. V. <https://orcid.org/0000-0001-9137-9551>

Dyatlov I.A. <https://orcid.org/0000-0003-1078-4585>

Potapov V. D. <https://orcid.org/0000-0002-5336-8234>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 14.03.2019

Accepted 20.03.2019

**Введение.** Туберкулезная инфекция входит в первую десятку смертельных инфекций в мире. В 2016 г. заболело 10,4 млн людей, в том числе 6,2 млн мужчин, 3,2 млн женщин и 1 млн детей. При этом умерло 1,7 млн человек, в том числе 0,4 млн ВИЧ-инфицированных. Около 95 % смертей от туберкулеза зафиксировано в слабо- и среднеразвитых странах. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), около ¼ человеческой популяции являются носителями латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ) без проявления

симптомов заболевания. Опасность ЛТБИ заключается в том, что высока вероятность активации инфекционного процесса – в течение жизни человека она составляет 5-15 %, а у некоторых групп населения с подавленной иммунной системой (ВИЧ-инфицированных, больных диабетом, курильщиц табака) – гораздо выше [1].

Наличие ЛТБИ у человека в отсутствие клинических признаков активного заболевания может быть определено с помощью реакции иммунологической сенсibilизации микобактериальными белками (кожная туберкулиновая проба), однако этот метод дает ложноположительные результаты у людей, вакцинированных «Бациллоу Кальметта-Герена» (BCG). В последнее десятилетие разработан новый, более

**Для корреспонденции:** Фурсов Михаил Васильевич, науч. сотр. отдела подготовки и усовершенствования специалистов; e-mail: mikhail.fursov88@gmail.com

специфичный метод определения ЛТБИ, основанный на высвобождении гамма-интерферона Т-лимфоцитами при контакте со специфическими антигенами *M. tuberculosis* (Interferon- $\gamma$  release assay, IGRA) [2, 3].

При попадании в легкие человека клетки *M. tuberculosis* фагоцитируются альвеолярными макрофагами, что приводит к мощным клеточно-опосредованным иммунным реакциям и образованию гранул, которые состоят, в основном, из Т-клеток и макрофагов, инфицированных туберкулезным микробом [4, 5]. Гранулемы подвергаются казеозному некрозу, что приводит к гибели большинства туберкулезных бактерий; при этом происходит разрушение участков тканей макроорганизма, окружающих гранулемы. Внутри образующихся каверн может присутствовать небольшое количество выживших туберкулезных бактерий, которые находятся в нереплицирующей форме с пониженной метаболической активностью [6, 7].

Клинические исследования латентной туберкулезной инфекции у человека и испытания новых диагностических, профилактических и лекарственных противотуберкулезных средств на человеке – высоко затратные и сложно выполнимые мероприятия. Экспериментальные исследования биологическими методами на животных моделях позволяют получить данные, восполняющие невозможность проведения клинических испытаний. Несмотря на то, что животные модели не позволяют полностью воспроизводить особенности развития туберкулезной инфекции у человека, они позволяют получить много полезных сведений о патогенезе инфекции и механизмах действия испытываемых противотуберкулезных препаратов. Использование биологических моделей *in vivo* и *in vitro* позволяет исследователям получить ответы на конкретные вопросы, связанные с переходом туберкулезного микроба в покоящееся состояние и активации туберкулезного процесса у пациентов.

Способность переходить в покоящееся состояние является важной особенностью клеток возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*. В научной литературе используется несколько разных взаимозаменяемых терминов для обозначения данного явления: «состояние покоя», «дормантность», «латентность» и «персистенция». Основными признаками перехода туберкулезного микроба в состояние покоя является сниженная метаболическая активность, устойчивость к антимикробным препаратам и отсутствие роста при культивировании на стандартных плотных питательных средах [8].

Существует большая путаница в отношении терминов покоящегося состояния микобактерий (дормантности), персистенции и латентной инфекции. Например, бактерии в модели Wayne and Hayes называли «покоящимися бактериями», но при этом при высеве на твердые питательные среды авторами были отмечены высокие значения колониеобразующих единиц (КОЕ) [9-11]. Для устранения дальнейшей терминологической путаницы было предложено использовать термины в следующих значениях: «покоящиеся бактерии» - бактерии, некультивируемые на твердых питательных средах, устойчивые к антимикробным препаратам, морфологически измененные и имеющие замедленный метаболизм [12]; «персистенция» - явление, отражающее способность бактерий выживать в организме хозяина в ходе продолжительной антибиотикотерапии - в отличие от покоящихся клеток, «клетки-персистеры» способны расти на твердых питательных средах; «латентная инфекция» - сбалансированное состояние взаимодействия бактерии и хозяина *in vivo*, не вызывающее видимых симптомов инфекции [13].

Данный обзор посвящен систематическому анализу опубликованных в отечественной и зарубежной научной литературе экспериментальных исследований по моделированию покоящегося состояния клеток *M. tuberculosis in vitro* и латентной туберкулезной инфекции *in vivo*. Хотя ни одна из описанных моделей не воспроизводит полностью ЛТБИ человека, эти мо-

дели внесли большой вклад в исследование отдельных этапов и механизмов феномена латентности и покоящегося состояния *M. tuberculosis*.

## Модели для изучения покоящегося состояния возбудителя туберкулеза *in vitro*

Моделирование формирования покоящегося состояния клеток *M. tuberculosis in vitro* важно для понимания процессов перехода микобактерий в дормантное состояние, поддержания этого статуса и выхода из него (реактивации туберкулезного микроба). К настоящему времени в доступной отечественной и зарубежной литературе нами обнаружены сведения о 16 разработанных моделях получения покоящихся форм *M. tuberculosis in vitro* в период с 1933 по 2017 г. (см. рисунок). В обзоре рассмотрены параметры, на которых основана конкретная модель (использованные штаммы *M. tuberculosis*, питательные среды, условия культивирования микобактерий), и полученные результаты. Большинство моделей получения покоящихся клеток *M. tuberculosis* основаны на длительном культивировании микобактерий в стрессовых условиях: кислородное голодание [14-16], недостаток питательных веществ [17-19], окислительный стресс [20], постепенное снижение pH [19, 21] и др. Использование перечисленных стрессов для микобактерий моделирует условия, в которых они существуют в гранулемах человека, больного туберкулезом [22].

### 1. Многолетний эксперимент Corper&Cohn, 1933 г. [29]

В Национальном Еврейском госпитале (Денвер, США) проведен многолетний эксперимент, начавшийся в 1920 г., по выращиванию культур 8 штаммов *M. tuberculosis* в жидкой питательной среде. Культивирование микобактерий проводили при температуре 37 °С. После 12 лет инкубирования культур *M. tuberculosis* на дне колб получены жизнеспособные клетки микобактерий, среди которых присутствовали морфологически измененные оvoidные формы. Вирулентность туберкулезных бактерий после длительного культивирования была подтверждена с помощью внутривенного введения морским свинкам и кроликам в 1942 г. после 70 пассажей и в 1943 г. после 77 пассажей.

### 2. Модель L.G.Wayne & L.G. Hayes, 1996 г.

На базе Медицинского Центра и Университета штата Калифорнии (США) разработана одна из самых популярных и цитируемых в научной литературе *in vitro* модель L.G.Wayne & L.G.Hayes [14], которая основана на постепенном истощении кислорода в закрытых пробирках с культурой *M. tuberculosis* H37Rv при перемешивании. Авторами изучена динамика чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам изониазиду, рифампицину, ципрофлоксацину и метронидазолу в ходе длительного культивирования в анаэробных условиях. Идентифицированы стадии покоящегося состояния клеток: нереплицирующиеся персисторы 1 (nonreplicating persistent stage 1, NRP1) и нереплицирующиеся персисторы 2 (nonreplicating persistent stage 2, NRP2). Переход в покоящуюся форму бактерий *M. tuberculosis* постулирован как эволюционный механизм существования в неблагоприятных условиях окружающей среды для неспорулирующих бактерий.

### 3. Пассирование микобактерий на первичной культуре мышинных макрофагов

При сотрудничестве научных лабораторий ФБУН «Государственный научный центр микробиологии и биотехнологии» (Оболensk), Института биохимии им. А.Н. Баха и Университета Вэйлса (Великобритания) S. Biketov и соавт. [30] в 2000 г. опубликована *in vitro* модель, основанная на



## 7. Культивирование в хемостате

В Центре прикладной микробиологии и исследований, Солсбери (Великобритания) В.W. James и соавт. [18] выращивали культуру *M. tuberculosis* H37Rv в закрытой системе хемостата с постоянным мониторингом температуры, pH, уровня кислорода. Клетки микобактерий выращивали в условиях углеродного голодания с аэрацией и без аэрации. Показано, что при кислородном голодании клетки микобактерий переходят в покоящееся состояние, характеризующееся измененным профилем экспрессии генов.

## 8. Культивирование в условиях NO-стресса

При сотрудничестве лабораторий Стэнфордской медицинской школы, университетов Колорадо, Вашингтона и Калифорнии (США) M.I. Voskuil и соавт. [20] продемонстрировали подавление процесса дыхания в клетках *M. tuberculosis* штамма H37Rv малыми дозами закиси азота в среде культивирования (50 мкМ диэтилентриамин/оксид азота). Показано, что малые концентрации NO увеличивают уровень экспрессии DosR регулятора, контролирующего регулон, состоящий из 48 генов, который, как было показано ранее, экспрессируется в клетках *M. tuberculosis* в экспериментах *in vivo* и подготавливает бактерии к переходу в покоящееся состояние *in vitro*, подавляет аэробное дыхание и снижает скорость деления клеток.

## 9. Культивирование в условиях голодания при низких значениях pH

В Университете Барселоны (Испания) S. Gordillo и соавт. [32] разработали *in vitro* модель с помощью выращивания клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv на питательной среде Middlebrook 7H9 до стационарной фазы с последующим переносом клеток в модифицированную среду Middlebrook 7H9 (pH = 5,5) и выращивания анаэробно при температуре 37 °C в течение 21 суток. Полученные микобактерии не были способны расти на стандартных питательных средах, но росли на богатой питательной среде, что указывает на их измененную природу. Продемонстрирована экспрессия в клетках генов *acr*, *icl*, *fbpB*, *rpoA* и *recA*, являющихся потенциальными маркерами покоящихся микобактерий.

## 10. Модель кислородного голодания

В совместной работе института исследований туберкулеза и Университета штата Иллинойс в Чикаго (США) S.H. Cho и соавт. [16] разработали модель для скрининга антибактериальных препаратов против покоящихся форм туберкулеза Low-Oxygen-Recovery Assay (LORA). Клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv (pFCAluxAB), предварительно сконструированного, несущего репортерную плазмиду с экспрессирующимся геном *luxAB* *Vibrio harveyi*, выращивали в течение 22 дней в питательной среде Dubos в ферментере анаэробно, аналогично модели Wayne L.G. & Hayes L.G. получения покоящихся форм микобактерий. В ходе культивирования проводили измерение сигнала люминесценции клеток в условиях кислородного голодания. Показано, что интенсивность сигнала люминесценции была пропорциональна количеству КОЕ туберкулезного микроба. На данной модели протестированы 31 антибактериальный препарат.

## 11. Модель множественного стресса

C. Deb и соавт. [19] культивировали клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv на базе лабораторий Университета Центральной Флориды (США) в условиях влияния четырех стрессовых факторов: кислородное голодание (5 %), повышенное содержание CO<sub>2</sub> (10 %), голодание (10-кратно разведенная среда Dubos)

и кислотность среды (pH=5,0). В результате микобактерии прекратили реплицироваться, потеряли кислотоустойчивость, накопили триацилглицерин и восковые эфиры, приобрели антибиотикоустойчивость к рифампицину и изониазиду, увеличили синтез липидов, образовывали овоидные формы, то есть приобрели все признаки покоящихся микобактериальных клеток.

## 12. Культивирование в условиях недостатка калия

Сотрудники Института биохимии им. А.Н. Баха РАН E.G. Salina и соавт. [33-35] выращивали клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv на модифицированной питательной среде Sauton, не содержащей калия, в течение 15 дней, после чего добавляли в среду 5 мг/л рифампицина для удаления активно делящихся клеток. Полученные покоящиеся клетки *M. tuberculosis* были неспособны к росту на твердых питательных средах. Реактивацию осуществляли с помощью отмывки клеток от бескальевой среды и культивирования в питательной среде Sauton.

## 13. Модель стрептомицин-ауксотрофного штамма

В лабораториях Глобального института здравоохранения (Швейцария) и Национальных институтов здоровья (США) C. Sala и соавт. [36] использовали стрептомицин-ауксотрофный штамм *M. tuberculosis* 18b для получения покоящихся форм микобактерий и тестирования на них лекарственных средств. Клетки штамма *M. tuberculosis* 18b культивировали с аэрацией при температуре 37 °C на питательной среде 7H9 Middlebrook в присутствии стрептомицина 50 мкг/мл до средней логарифмической фазы, после чего клетки отмывали фосфатным буфером и помещали в питательную среду без стрептомицина, инкубировали при температуре 37 °C с аэрацией в течение 10 дней. После культивирования клеток *M. tuberculosis* 18b в питательной среде без стрептомицина полученные клетки не росли на плотных питательных средах и были устойчивы к антимикубактериальным препаратам. Реактивацию покоящихся форм микобактерий проводили с помощью добавления в питательную среду стрептомицина.

## 14. Выращивание в условиях постепенного закисления среды

При сотрудничестве лабораторий Института биохимии им. А.Н. Баха, Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина (Пушино) и Института микробиологии им. С.Н. Виноградского (Москва) M.O. Shleeva и соавт. [21] разработана модель, основанная на выращивании клеток *M. tuberculosis* H37Rv в питательной среде Sauton в течение 12-15 дней. Полученные клетки пересевали в модифицированную питательную среду Sauton (pH=6,0-6,2) и инкубировали аэробно при температуре 37 °C. После 37-45 дней инкубации клетки переносили в анаэробные стационарные условия при комнатной температуре на 135-143 дней. Препараты покоящихся клеток получали фильтрованием через фильтр с порами 0,22 мкм. Изучена форма полученных покоящихся клеток (овоидные бактерии), которые были устойчивы к повреждающим факторам (прогревание и антибиотики) и утратили способность формировать колонии на твердых питательных средах, но реактивировались при инкубировании в супернатанте активно растущей культуры *M. tuberculosis* или при добавлении рекомбинантного белка Rpf.

## 15. Модель гранулемы человека *in vitro*

В Университете Центральной Флориды (США) N. Karoog и соавт. [37] использовали для культивирования клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC), которые смешивали в лунках 96-луночного планшета при комнатной температуре

с препаратом внеклеточного матрикса (ЕСМ) и клетками микобактерий, инкубировали 45 мин при температуре 37 °С. Затем в суспензию добавляли питательную среду RPMI с 20 % человеческой сывороткой и инкубировали 8 суток при температуре 37 °С. Было показано, что инфицированные микобактериями клетки РВМС образовывали микрогранулемы. При этом клетки *M. tuberculosis* переходили в состояние покоя, что подтверждено потерей ими кислотоустойчивости при окрашивании, накоплением липидных тел, развитием устойчивости к рифампицину и изменением экспрессии генов. Обработка гранул моноклональными антителами анти-TNF $\alpha$  вызвала реактивацию покоящихся клеток *M. tuberculosis*.

## 16. Модификация модели Wayne L.G. & Hayes L.G. в среде, богатой липидами

В работах сотрудников Национального политехнического института, Национального института вирусологии и Национального института перинатологии Исидро Эспиноса де лос Рейес, Мехико (Мексика) M.D. Sotomayor и соавт., D.A. Aguilar-Ayala и соавт. [38,39] описано культивирование клеток штамма *M. tuberculosis* H37Rv в питательной среде Dubos без глицерина, содержащей 0,5 % альбумина, липидную смесь (олеиновая, пальмитиновая и стеариновая кислоты в концентрации 0,001 % каждая) и 0,01 % холестерина при температуре 37 °С в пробирках, позволяющих контролировать доступ кислорода. По достижении экспериментальных стадий гипоксии NRP1 и NRP2, описанных в модели Wayne L.G. & Hayes L.G., что детектировали в присутствии метиленового синего 1.5 мг/мл, в культуру вносили смесь антибиотиков рифампицин/моксифлоксацин/амикацин/метронидазол или рифампицин/моксифлоксацин/амикацин/претоманид для определения чувствительности полученных клеток к антимикобактериальным препаратам. Реактивацию микобактерий проводили, переводя культуру в аэробные условия. В данной модели микобактерии подвергались одновременно двум стрессам - кислородному голоданию и воздействию токсических продуктов метаболизма холестерина (пропионил-СоА), что моделировало условия существования микобактерий в макрофагах, содержащих большое количество липоидных тел с холестерином. Модель использована для изучения уровня экспрессии генов *dosR*, *tgsl*, *lipY*, *fadD21*, *mmpL7*, *esxA* и др., которые связаны с проявлением дормантности и вирулентности клеток *M. tuberculosis*.

## In vivo модели для изучения латентной туберкулезной инфекции

Моделирование ЛТБИ человека *in vivo* на животных, в отличие от моделей покоящегося состояния *M. tuberculosis in vitro*, позволяет рассматривать вопросы разных стадий патогенеза на фоне развития иммунной защиты хозяина, что имеет решающее значение для формирования латентной формы инфекции. К настоящему времени созданы *in vivo*-модели ЛТБИ на представителях 5 таксономических групп теплокровных животных: мышах, крысах, кроликах, морских свинках и приматах (см. рисунок).

Наиболее адекватными животными моделями ЛТБИ человека являются модели латентного туберкулеза на приматах (макаках) *Macaca fascicularis* и *Macaca mulatta*, так как эти животные имеют большое анатомическое и физиологическое сходство с человеком [23]. Недостатком моделей ЛТБИ на приматах является высокая стоимость животных и их содержания.

Мышиные (*Muridae Mus*) модели являются наиболее используемыми и подробно охарактеризованными, успешно используются для изучения патогенеза туберкулеза. Использование мышиных моделей обусловлено их удобством,

возможностью проведения масштабных экспериментов, доступностью различных линий мышей недорогого содержания. Однако, туберкулезная инфекция у мышей отличается от человеческой болезни отсутствием казеозного некроза гранул [24, 25].

Более адекватной моделью для изучения ЛТБИ, по сравнению с мышинной моделью, является модель на кроликах. Развитие туберкулеза у людей и у кроликов имеет много общего, в том числе - формирование центра казеозного некроза в легких в ответ на микобактериальную инфекцию. Кролики природно устойчивы к инфицированию *M. tuberculosis*, что обеспечивает в эксперименте формирование латентной инфекции у этих животных.

Недавно предложено использование нового вида животных для моделирования ЛТБИ - хлопковые крысы *Sigmodon hispidus*. По сравнению с крупными животными хлопковые крысы дешевле, их легко содержать в больших группах, подробно изучены особенности их иммунной системы, что позволяет анализировать иммунный ответ организма в ходе ЛТБИ. По сравнению с другими моделями на грызунах у хлопковых крыс после легочного заражения туберкулезом развиваются гранулемы с дальнейшим развитием казеозного некроза и происходит распространение патогена в лимфоидные органы, как у человека.

На модели морских свинок *Cavia porcellus* сложно получить ЛТБИ, потому что эти животные высокочувствительны к низкодозовому заражению *M. tuberculosis*. Для моделирования ЛТБИ на морских свинках предложено использовать заражение мутантными штаммами *M. tuberculosis* со сниженной вирулентностью [26, 24]. По сравнению с мышинными моделями, в организме морских свинок при заражении туберкулезом формируются гранулемы, более схожие с таковыми у человека по клеточному составу гранулем и наличию казеозного некроза.

В настоящем обзоре рассмотрены модели ЛТБИ *in vivo*, разработанные к настоящему времени: принцип, на котором основана конкретная модель, и подтверждение развития у животных ЛТБИ.

## 1. Мышиная модель Корнеллского университета

В работах сотрудников Корнеллского университета, Нью-Йорк (США) R.M. McCune, R. Tompsett и соавт. [40-42] впервые были описаны эксперименты по моделированию ЛТБИ у мышей. Авторами были использованы белые мыши линии Swiss Webster, которых заражали внутривенно клетками *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 0,5-2 $\times$ 10<sup>6</sup> КОЕ, а полученную туберкулезную инфекцию лечили в течение 12 нед антимикобактериальными препаратами изониазидом и пиразинамидом. После 12-недельной химиотерапии из органов мышей микобактерии высеять не удалось. По завершении антибиотикотерапии в течение 2-3 мес мышам вводили кортизон, после чего из легких и селезенки 50 % мышей авторам удалось высеять клетки *M. tuberculosis*. На этом основании был сделан вывод о том, что после антибиотикотерапии у мышей сформировалась ЛТБИ, а в результате введения кортизона произошла реактивация туберкулезной инфекции.

## 2. Модель медленно прогрессирующей первичной туберкулезной инфекции у мышей

Сотрудниками университета Осло (Норвегия) (Phyu et al. и Mustafa et al.) [25,43] опубликованы результаты разработки модели медленно прогрессирующей первичной ТБИ на гибридных мышах линии B6D2F1. Возбудитель туберкулеза *M. tuberculosis* H37Rv в дозе 1,5 $\times$ 10<sup>6</sup> КОЕ вводили мышам внутривенно, наблюдали за животными в течение 70 недель. При этом не осуществляли никакой лекарственной терапии. В результате у мышей формировалась ЛТБИ, что подтверждали

с помощью активации туберкулезного процесса с помощью подавления иммунной системы мышей кортикостероном. Кроме того, ЛТБИ у мышей подтверждали микробиологическими, гистопатологическими и иммуногистохимическими исследованиями. Спонтанной реактивации туберкулезной инфекции у мышей не наблюдалось в течение 70 недель.

### 3. Модель ЛТБИ у Яванских макак *Macaca fascicularis*

В университете Питсбурга, штат Пенсильвания (США) S.V.Сариано и соавт., P.L.Lin и соавт. [44,45] разработана модель ЛТБИ на приматах - Яванских макаках *Macaca fascicularis*. Животных (17 особей) заражали низкими дозами (~25 КОЕ) вирулентного штамма *M. tuberculosis* Erdman через бронхоскопическую инстилляцию в легкие. Туберкулезная инфекция, вызванная у *Macaca fascicularis* низкими дозами бактерий этого штамма, по мнению авторов, полностью моделировала туберкулезную инфекцию у человека. У 40 % зараженных обезьян инфекция не прогрессировала в течение 15-20 мес, при этом симптомы туберкулезной инфекции полностью отсутствовали. Наличие ЛТБИ у этих особей было диагностировано с помощью кожного туберкулинового теста и методом оценки пролиферации лимфоцитов, а также наличием небольшого количества фиброзных гранулем в легких.

### 4. Модель туберкулезной инфекции у мышей с имплантатом, содержащим культуру микобактерий

В лаборатории Университета Джонса Хопкинса, Балтимор, США, авторами P.C. Karakousis и соавт. [7] создана модель туберкулезной инфекции у иммунокомпетентных мышей безволосой линии (нуды) SKH1. Моделирование осуществляли путем подкожного введения имплантата, содержащего клетки штамма *M. tuberculosis* H37Rv-*lux*, экспрессирующие ген люциферазы. Вокруг имплантата развивались гранулематозные поражения тканей, содержащие клетки *M. tuberculosis*, быстро входящие в измененное физиологическое состояние, характеризуемое количеством КОЕ стационарного состояния, снижением метаболической активности микобактерий и устойчивостью к изониазиду. Получены данные полногеномного транскриптомного анализа клеток *M. tuberculosis*, находящихся в гранулемах мыши.

### 5. Низко-дозовая модель

При сотрудничестве Центрального НИИ туберкулеза и фармацевтической компании Sequella, Inc., США [46] опубликованы результаты моделирования латентной туберкулезной инфекции при помощи внутривенного введения клеток *M. tuberculosis* H37Rv, выращенных до средней логарифмической фазы и дезагрегированных (в дозе ~70 КОЕ), мышам трех линий: высокочувствительной к туберкулезу линии I/StSnEgYCit (I/St), генетически устойчивой к туберкулезу линии C57BL6/JCit (B6) и (I/St×B6)F1 гибридов, которые были более резистентны к туберкулезу, чем родительские линии. Внутривенное введение низких доз туберкулезного микроба приводило к хронической нелетальной персистенции микобактерий у генетически резистентных мышей, но вызывало смертельный патологический процесс у генетически чувствительных животных. Различия между инфекционным процессом в организмах мышей разных линий подтверждены на гистологическом и иммунологическом уровнях.

### 6. Модель латентного туберкулеза у мышей линии BALB/c

Ученые из Института Форсайт, Бостон, и Университета Колорадо, США [26] заражали мышей линии BALB/c вну-

тривенно в дозе ( $2 \times 10^6$  КОЕ) стрептомицин-ауксотрофным штаммом *M. tuberculosis* 18b с последующим ежедневным подкожным введением мышам стрептомицина в течение четырех недель. У животных определяли микобактериальную нагрузку в легких и селезенке на 7, 14, 21, 28 и 180 день после заражения. Спустя 6 мес после завершения введения стрептомицина из органов животных были высеяны жизнеспособные клетки *M. tuberculosis* 18b на искусственную среду со стрептомицином. Гистологические исследования печени, легких и селезенки показали наличие хорошо сформированных гранулем. Иммуногистохимические исследования выявили наличие иммунного ответа во время латентной инфекции у животных.

### 7. Модель хронического туберкулеза на мышцах линии C57BL

В Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии при сотрудничестве с Институтом биохимии им А.Н. Баха [47 – 49] моделировали формирование хронического туберкулеза в результате внутрибрюшинного заражения мышей линии C57BL клетками *M. tuberculosis* штамма H37Rv в дозе  $\sim 10^4$  КОЕ/мышь. Реактивацию ЛТБИ проводили с помощью аминоканидина. Установлена точка стабилизации концентрации микроорганизмов в органах (через 3 мес  $10^3$ - $10^4$  КОЕ на орган). Уровень числа КОЕ в легких и селезенке устойчиво сохранялся в течение последующего года наблюдений.

### 8. Аэрозольная модель формирования латентного туберкулеза у кроликов

Лаборатория Университета Джонса Хопкинса, Корнеллского университета, Университета Джорджа Вашингтона, Центра здоровья Техаса, и Колледж медицины Эйнштейна, США [50] создали ЛТБИ модель на белых новозеландских кроликах, заражая их аэрозольно клетками *M. tuberculosis* H37Rv в низкой дозе  $10^3$  КОЕ. Реактивацию ТБИ осуществляли внутримышечным введением дексаметазона в период с 10 по 15 неделю после заражения кроликов. Через 5 нед после заражения у части кроликов зафиксировано формирование небольшого количества легочных гранулем, при этом в последующие 36 нед бактериальная нагрузка и размер гранулем не изменялись. Содержащиеся внутри гранулем микобактерии находились в покоящемся состоянии, что подтверждено: нераспространением их за пределы гранулем, некультивируемостью на питательном агаре и отсутствием заражающей способности гомогената легких кроликов в тесте на морских свинках и отсутствием случаев спонтанной реактивации инфекции у кроликов.

### 9. Модель латентного туберкулеза у беспородных морских свинок Хартли

В совместной публикации сотрудников Института Форсайт и Университета Колорадо, США [51] описана модель ЛТБИ на морских свинках. Животных заражали внутривенно клетками стрептомицин-ауксотрофного штамма *M. tuberculosis* 18b в дозе  $10^7$  КОЕ, с последующим ежедневным подкожным введением стрептомицина в течение трех недель. В течение 6 мес после заражения и лечения стрептомицином у животных не наблюдали клинических симптомов туберкулезной инфекции (летаргия, потертый мех и потеря веса). У свинок определяли микобактериальную нагрузку в легких и селезенке на 1, 15, 30, 90 и 180 день после заражения. Спустя 6 мес после завершения введения стрептомицина из органов животных были высеяны жизнеспособные клетки *M. tuberculosis* 18b на искусственную среду со стрептомицином. Гистологические исследования печени, легких и селезенки показали наличие хорошо сформированных гранулем. Иммуногистохимические исследования выявили наличие иммунного ответа во время латентной инфекции у морских свинок.

## 10. Корнелл-подобная модель

Коллективом сотрудников Центрального НИИ туберкулеза [52] предложено использовать мышей линии I/StSnEgYCit (I/St), высокочувствительной к туберкулезу, которые были инфицированы аэрозольно клетками *M. tuberculosis* H37Rv, выращенными до средней логарифмической фазы и дезагрегированными, в дозе ~100 КОЕ/мышь. Через 1 мес после заражения мышей подвергали трехмесячной антибиотикотерапии рифампицином и изониазидом. После трехмесячного лечения у мышей в легких были обнаружены обширные зоны поражения тканей. Через 13 мес после начала эксперимента у части мышей легочная ткань не отличалась от нормы, а у другой части – в легких наблюдалась остаточная патология, при этом микобактерии не высевались на питательные среды, но их присутствие обнаруживалось с помощью методов ПЦР и микроскопии.

## 11. Модель ЛТБИ на хлопковых крысах *Sigmodon hispidus*

При сотрудничестве Военно-медицинского университета и фармацевтических компаний Sequella и Virion Systems (США) Elwood и соавт. [53] опубликована работа, в которой инбредных хлопковых крыс *S. hispidus* заражали интраназально клетками *M. tuberculosis* H37Rv в дозе  $3,9 \times 10^3$  КОЕ. У части выживших животных не было признаков туберкулезной инфекции (потеря веса, образование гранулем, наличие культивируемых бацилл в легких и селезенке). На 9-м месяце после заражения проводили иммуносупрессию животных циклофосфамидом в дозе 50 мг/кг в течение 4 недель. У всех животных после курса иммунодепрессанта зафиксирована активная форма туберкулезной инфекции.

## 12. Модель латентного туберкулеза у беспородных морских свинок линии Хартли

В НИИ туберкулеза (Токио, Япония) [24] разработана модель ЛТБИ на морских свинках, которые были инфицированы подкожно 100 КОЕ штамма *M. tuberculosis* H37Rv-GFP с экспрессией зеленого флуоресцентного белка (GFP). В течение последующих 10 мес проводили туберкулиновый кожный тест для проверки статуса инфекции. Через 10 мес у животных, инфицированных *M. tuberculosis* H37Rv-GFP, не было выявлено макроскопических повреждений легких, но обнаруживались микрогранулемы в легких, печени и селезенке. На 180 и 300 день после инфицирования животных уровень бактериальной нагрузки в легких составлял 121 и 360 КОЕ, соответственно, а в селезенке – 10 и 25 КОЕ, соответственно, что, по мнению авторов, указывало на наличие хронической туберкулезной инфекции.

## 13. Модель ЛТБИ у низших приматов макак-резус *Macaca mulatta*

В работе сотрудников Национального исследовательского центра приматов Тулана (США) [54] описана *in vivo* модель ЛТБИ на низших приматах. Макак-резус *Macaca mulatta* (12 особей), заражали дозами (~500 КОЕ) слабовирулентного штамма *M. tuberculosis* CDC1551 аэрозольным путем. ЛТБИ определяли по отсутствию симптомов туберкулеза у макак (повышение температуры тела, потеря веса, отклонения в биохимии и общем анализе крови) и наличию положительной реакции в туберкулиновом кожном тесте и в тесте IGRA. Шесть животных с ЛТБИ спустя 9 нед после заражения туберкулезом инфицировали внутривенно Симианским вирусом иммунодефицита. Все 12 макак-резусов к 7 нед после заражения микобактериями имели положительную реакцию в туберкулиновом кожном тесте и в тесте IGRA. В группе, зараженной Симианским вирусом иммунодефицита, после 9 нед ко-инфекции, у

животных наблюдали признаки реактивации туберкулеза (увеличение температуры, снижение веса тела, потерю аппетита, увеличение уровня сывороточного С-реактивного белка, гранулематозную иммунопатологию, выявляемую при рентгенографии грудной клетки, а также гистопатологию при вскрытии и высева микобактерий из бронхоальвеолярного лаважа).

## 14. Реактивация «некультивируемых» клеток *M. tuberculosis*, полученных *in vitro*, в организме мыши

В совместной работе лабораторий Института биохимии им. А.Н. Баха РАН и Центрального НИИ туберкулеза [55] изучали покоящиеся «некультивируемые» клетки *M. tuberculosis* H37Rv, полученные по методике, описанной выше [21], которые вводили в дозе ~ $10^5$  КОЕ в трахею мышей линий I/St и B6, описанных Radaeva et al. [46]. Динамику развития туберкулезной инфекции отслеживали в течение последующих 1,5 лет. На 6-м месяце после заражения у нескольких мышей линии I/St, генетически чувствительной к туберкулезу, были зафиксированы симптомы туберкулезной инфекции (потертый мех и потеря веса). На 8 месяце после заражения количество микобактерий в легких животных увеличилось: у животных линии I/St - до  $10^7$ , и у животных линии B6 – до  $10^6$  КОЕ. Кроме того, было зафиксировано распространение инфекции в селезенку (I/St  $10^6$  КОЕ и B6  $10^4$  КОЕ). Микобактериальная нагрузка в органах животных оставалась практически неизменной в течение последующих 7 мес наблюдений.

**Заключение.** В ходе латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ) человека возбудитель туберкулеза присутствует в тканях организма и вызывает целый спектр патологических изменений, хотя не вызывает клинических проявлений заболевания. Создание моделей ЛТБИ человека *in vitro* и *in vivo* нацелено на: изучение особенностей механизмов перехода возбудителя туберкулеза в состояние покоя, поддержания этого статуса и реактивации во время скрытой инфекции; описание взаимодействия микро- и макроорганизма на клеточном и тканевом уровнях; оценку реакции макроорганизма на бессимптомную туберкулезную инфекцию; испытание новых антитуберкулезных препаратов и тест-систем.

С помощью *in vitro*-моделей, опубликованных в отечественной и зарубежной литературе, было выяснено, что длительное культивирование клеток *M. tuberculosis* в стрессовых условиях, симулирующих внутриклеточную среду в макрофагах, приводит к формированию покоящихся форм микобактерий, которые не способны расти на плотных питательных средах, устойчивы к антибактериальным препаратам, имеют специфическую морфологию, сниженный метаболизм и специфичный для этого состояния транскриптом и протеом. Основной проблемой для всех моделей «покоя» *in vitro* является наличие клеток с различным физиологическим статусом в популяции [27]. Благодаря изучению *in vivo*-моделей, созданных на теплокровных животных, раскрыты особенности взаимодействия микобактерий и макроорганизма на клеточном, тканевом и организменном уровнях.

Все эти модели имеют присущие им достоинства и недостатки: ни одна из моделей не отражает полностью картину ЛТБИ у человека, однако использование каждой модели приближает нас к пониманию отдельных этапов и механизмов, имеющих место во время бессимптомной туберкулезной инфекции, позволяет более подробно разработать принципы создания новых тест-систем и испытать новые профилактические и лечебные препараты [28]. Подтверждением адекватности использования двух типов моделей является то, что данные транскриптомного и протеомного анализов *M. tuberculosis* в *in vitro*- и *in vivo*-моделях в значительной степени сходны.

Несмотря на то что к настоящему времени разработано достаточно большое количество моделей *in vitro* и *in vivo* для изучения ЛТБИ, поиск новых моделей продолжается с целью приближения к идеальной модели для выяснения неразрешенных вопросов в области диагностики, лечения и профилактики латентного туберкулеза.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной темы НИР Роспотребнадзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–47, 50–55 см. REFERENCES)

48. Шрамко П.А., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Потапов В.Д., Капрелянц А.С., Бикетов С.Ф. Моделирование хронической туберкулезной инфекции у мышей методом внутрибрюшинного заражения и анализ активации аминогликозидом мутантов штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37RV с делециями по генам *grf*. *Туберкулез и болезни легких*. 2010; 4: 47-50.
49. Потапов В.Д. Разработка и применение биологических моделей для изучения хронической туберкулезной инфекции. Оболенск: ФБУН ГНЦ ПМБ; 2013.

#### REFERENCES

1. Global tuberculosis report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-4-156551-6. URL: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
2. Zwerling A., Pai M. The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2011; 9(8): 559-61.
3. Rangaka M.X., Wilkinson K.A., Glynn J.R., Ling D., Menzies D., Mwansa-Kambafwile J., Fielding K., Wilkinson R.J., Pai M. Predictive value of interferon- $\gamma$  release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12(1): 45-55.
4. Flynn J.L., Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect. Immun.* 2001; 69: 4195-4201.
5. Kaplan G., Post F.A., Moreira A.L., Wainwright H., Kreiswirth B.N., Tanverdi M., Mathema B., Ramaswamy S.V., Walther G., Steyn L.M., Barry C. E., Bekker L. G. *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect. Immun.* 2003; 71: 7099-7108.
6. Grosset J. *Mycobacterium tuberculosis* in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 833-6.
7. Karakousis P.C., Yoshimatsu T., Lamichhane G., Woolwine S.C., Nuermberger E.L., Grosset J., Bishai W.R. Dormancy phenotype displayed by extracellular *Mycobacterium tuberculosis* within artificial granulomas in mice. *J. Exp. Med.* 2004; 200(5): 647-57.
8. Wayne L.G., Sphaskey C.D. Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001; 55: 139-63.
9. Wayne L.G., Sramek H.A. Metronidazole is bactericidal to dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38: 2054-8.
10. Murugasu-Oei B., Dick T. J. Bactericidal activity of nitrofurans against growing and dormant *Mycobacterium bovis* BCG. *Antimicrob. Chemother.* 2000; 46: 917-9.
11. Mayuri, Bagchi G., Das T.K., Tyagi J.S. Molecular analysis of the dormancy response in *Mycobacterium smegmatis*: expression analysis of genes encoding the DevR/DevS two-component system, Rv3134c and chaperone alpha-crystallin homologues. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002; 211: 231-7.
12. Ignatov D.V., Salina E.G., Fursov M.V., Skvortsov T.A., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. Dormant non-culturable *Mycobacterium tuberculosis* retains stable low-abundant mRNA. *BMC Genomics.* 2015; 16: 954.
13. Zhang Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Biosci.* 2004; 1(9): 1136-56.
14. Wayne L.G., Hayes L.G. An *in vitro* model for sequential study of shift-down of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect. Immun.* 1996; 6: 2062-9.
15. Hu Y., Mangan J.A., Dhillon J., Sole K.M., Mitchison D.A., Butcher P.D., Coates A.R. Detection of mRNA transcripts and active transcription in persistent *Mycobacterium tuberculosis* induced by exposure to rifampin or pyrazinamide. *J. Bacteriol.* 2000; 182: 6358-65.
16. Cho S.H., Warit S., Wan B., Hwang C.H., Pauli G.F., Franzblau S.G. Low-oxygen-recovery assay for high-throughput screening of compounds against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 1380-5.
17. Betts J.C., Lukey P.T., Robb L.C., McAdam R.A., Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol. Microbiol.* 2002; 3: 717-31.
18. James B.W., Bacon J., Hampshire T., Morley K., Marsh P.D. *In vitro* gene expression dissected: chemostat surgery for *Mycobacterium tuberculosis*. *Comp. Funct. Genomics.* 2002; 3: 345-7.
19. Deb C., Lee C. M., Dubey V., Daniel J., Abomoelak B., Sirakova T., Pawar S., Rogers L., Kolattukudy P. E. A novel *in vitro* multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. *PLoS One.* 2009; 4: e6077.
20. Voskuil M.I., Schnappinger D., Visconti K.C., Harrell M.I., Dolganov G.M., Sherman D.R., Schoolnik G.K. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J. Exp. Med.* 2003; 198: 705-13.
21. Shleeva M.O., Kudykina Y.K., Vostroknutova G.N., Suzina N.E., Mulyukin A.L., Kaprelyants A.S. Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification. *Tuberculosis (Edinb.)*. 2011; 91(2): 146-54.
22. Alnimr A.M. Dormancy models for *Mycobacterium tuberculosis*: A minireview. *Braz. J. Microbiol.* 2015; 46(3): 641-7.
23. Carlsson H.E., Schapiro S.J., Farah I., Hau J. Use of primates in research: a global overview. *Am. J. Primatol.* 2004; 63: 225-37.
24. Sugawara I., Udagawa T., Aoki T., Mizuno S. Establishment of a guinea pig model of latent tuberculosis with GFP-introduced *Mycobacterium tuberculosis*. *Tohoku. J. Exp. Med.* 2009; 3: 257-62.
25. Phyu S., Mustafa T., Hofstad T., Nilsen R., Fosse R., Bjune G. A mouse model for latent tuberculosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 1998; 1(30): 59-68.
26. Kashino S.S., Ovendale P., Izzo A., Campos-Neto A. Unique model of dormant infection for tuberculosis vaccine development. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; 9: 1014-21.
27. Young M., Mukamolova G.V., Kaprelyants A.S. Mycobacterial dormancy and its relation to persistence. In: *Mycobacterium: molecular microbiology*. Ed. Parish T. London, United Kingdom: Horizon Bioscience; 2005; 265-320.
28. Lanoix J.P., Betoudji F., Nuermberger E. Novel regimens identified in mice for treatment of latent tuberculosis infection in contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(4): 2316-21.
29. Corper H.J., Cohn M.L. The virulence of tubercle bacilli and the fallacy of assuming the grade of virulence from arbitrary designations. *Am. Rev. Tuberc.* 1933; 28: 856-74.
30. Biketov S., Mukamolova G.V., Potapov V., Gilenkov E., Vostroknutova G., Kell D.B., Young M., Kaprelyants A.S. Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promotes recovery. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000; 29(4): 233-40.
31. Shleeva M.O., Bagramyan K., Telkov M.V., Mukamolova G.V., Young M., Kell D.B., Kaprelyants A.S. Formation and resuscitation of "non-culturable" cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiology.* 2002; 148(5): 1581-91.
32. Gordillo S., Guirado E., Gil O., Díaz J., Amat I., Molinos S., Vilaplana C., Ausina V., Cardona P.J. Usefulness of *acr* expression for monitoring latent *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in 'in vitro' and 'in vivo' experimental models. *Scand. J. Immunol.* 2006; 64(1): 30-9.
33. Salina E.G., Mollenkopf H.J., Kaufmann S.H., Kaprelyants A.S. *M. tuberculosis* Gene Expression during Transition to the "Non-Culturable" State. *Acta Naturae.* 2009; 1(2): 73-7.
34. Salina E., Ryabova O., Kaprelyants A., Makarov V. New 2-thiopyridines as potential candidates for killing both actively growing and dormant *Mycobacterium tuberculosis* cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014a; 58(1): 55-60.
35. Salina E.G., Waddell S.J., Hoffmann N., Rosenkrands I., Butcher P.D., Kaprelyants A.S. Potassium availability triggers *Mycobacterium tuberculosis* transition to, and resuscitation from, non-culturable (dormant) states. *Open Biol.* 2014b; 4(10) pii 140106.
36. Sala C., Dhar N., Hartkoorn R.C., Zhang M., Ha Y.H., Schneider P., Schneider P., Cole S.T. Simple model for testing drugs against nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(10): 4150-8.
37. Kapoor N., Pawar S., Sirakova T.D., Deb C., Warren W.L., Kolattukudy P.E. Human granuloma *in vitro* model, for TB dormancy and resuscitation. *PLoS One.* 2013; 8(1): e53657.
38. Soto-Ramirez M.D., Aguilar-Ayala D.A., Garcia-Morales L., Rodriguez-Peredo S.M., Badillo-Lopez C., Rios-Muñiz D.E., Meza-Segura M.A., Rivera-Morales G.Y., Leon-Solis L., Cerna-Cortes J.F.,

- Rivera-Gutierrez S., Helguera-Repetto A.C., Gonzalez-Y-Merchand J.A. Cholesterol plays a larger role during *Mycobacterium tuberculosis* in vitro dormancy and reactivation than previously suspected. *Tuberculosis* (Edinb.). 2017; 103: 1-9.
39. Aguilar-Ayala D.A., Cnockaert M., Vandamme P., Palomino J.C., Martin A., Gonzalez-Y-Merchand J. Antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* under *in vitro* lipid-rich dormancy conditions. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(3): 282-285.
40. McCune R. M., Tompsett R. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. I. The persistence of drug susceptible tubercle bacilli in the tissues despite prolonged antimicrobial therapy. *J. Exp. Med.* 1956a; 104: 737.
41. McCune R.M., Tompsett R., McDermott W. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculosis infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J. Exp. Med.* 1956b; 104: 763.
42. McCune R.M., Feldmann F.M., Lambert H.P., McDermott W. Microbial persistence. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. *J. Exp. Med.* 1966; 123: 445-68.
43. Mustafa T., Phyu S., Nilsen R., Jonsson R., Bjune G. In situ expression of cytokines and cellular phenotypes in the lungs of mice with slowly progressive primary tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 1999; 2: 127-36.
44. Capuano S.V., Croix D.A., Pawar S., Zinovik A., Myers A., Lin P.L., Bissel S., Fuhrman C., Klein E., Flynn J.L. Experimental *Mycobacterium tuberculosis* infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human *M. tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 2003; 10: 5831-44.
45. Lin P.L., Rodgers M., Smith L., Bigbee M., Myers A., Bigbee C., Chiosea I., Capuano S.V., Fuhrman C., Klein E., Flynn J. L. Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model. *Infect. Immun.* 2009; 10: 4631-42.
46. Radaeva T.V., Nikonenko B.V., Mischenko V.V., Averbakh M.M. Direct comparison of low-dose and Cornell-like models of chronic and reactivation tuberculosis in genetically susceptible I/St and resistant B6 mice. Jr, Apt A.S. *Tuberculosis* (Edinb.). 2005; 1-2: 65-72.
47. Biketov S., Potapov V., Ganina E., Downing K., Kana B.D., Kaprelyants A. The role of resuscitation promoting factors in pathogenesis and reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* during intra-peritoneal infection in mice. *BMC Infect. Dis.* 2007; 7: 146.
48. Shramko P.A., Grishenko N.S., Rudnitskaya T.I., Potapov V.D., Kaprelyants A.S., Biketov S.F. Modelling of chronic tuberculosis infection in mice by intraperitoneal infection and analysis of aminoguanidin activation in mutants of the *Mycobacterium tuberculosis* strain H37RV with *rpf* gene deletions. *Tuberkulez i bolezni legkikh*, 2010; 4: 47-50. (in Russian)
49. Potapov V.D. Development and application of biological models to study chronic tuberculosis infection. Obolensk: SRCAMB; 2013. (in Russian)
50. Manabe Y.C., Kesavan A.K., Lopez-Molina J., Hatem C.L., Brooks M., Fujiwara R., Hochstein K., Pitt M.L., Tufariello J., Chan J., McMurray D. N., Bishai W. R., Dannenberg A. M. Jr, Mendez S. The aerosol rabbit model of TB latency, reactivation and immune reconstitution inflammatory syndrome. *Tuberculosis* (Edinb.). 2008; 3: 187-96.
51. Kashino S.S., Napolitano D.R., Skobe Z., Campos-Neto A. Guinea pig model of *Mycobacterium tuberculosis* latent/dormant infection. *Microbes Infect.* 2008; 10(14-15): 1469-76.
52. Radaeva T.V., Kondratieva E.V., Sosunov V.V., Majorov K.B., Apt A. A human-like TB in genetically susceptible mice followed by the true dormancy in a Cornell-like model. *Tuberculosis* (Edinb.). 2008; 88: 576-85.
53. Elwood R.L., Rajnik M., Wilson S., Yim K., Blanco J.C., Nikonenko B., Hemming V.G. Characterization of late tuberculosis infection in *Sigmodon hispidus*. *Tuberculosis* (Edinb.). 2009; 89(2): 183-8.
54. Mehra S., Golden N.A., Dutta N.K., Midkiff C.C., Alvarez X., Doyle L.A., Asher M., Russell-Lodrigue K., Monjure C., Roy C.J., Blanchard J.L., Didier P.J., Veazey R.S., Lackner A.A., Kaushal D. Reactivation of latent tuberculosis in rhesus macaques by coinfection with simian immunodeficiency virus. *J. Med. Primatol.* 2011; 40(4): 233-43.
55. Shleeva M., Kondratieva T., Rubakova E., Vostroknutova G., Kaprelyants A., Apt A. Reactivation of dormant "non-culturable" *Mycobacterium tuberculosis* developed *in vitro* after injection in mice: both the dormancy depth and host genetics influence the outcome. *Microb. Pathog.* 2015; 78: 63-6.

Поступила 14.03.19  
Принята к печати 20.03.19

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Чеснокова М. Г.<sup>1,2</sup>, Чесноков В. А.<sup>3</sup>, Миронов А. Ю.<sup>4</sup>

## ПРИМЕНЕНИЕ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ С ЦЕЛЬЮ ИЗУЧЕНИЯ БИОПЛЁНОК *CANDIDA ALBICANS* НА ПОВЕРХНОСТИ БАЗИСНЫХ ПЛАСТМАСС СЪЁМНЫХ ОРТОПЕДИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ

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

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Омский государственный технический университет» Министерства науки и высшего образования РФ, 644050, Омск, Россия;

<sup>3</sup>БУЗОО ГСП №4, 644030, Омск, Россия;

<sup>4</sup>ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия

*Наиболее распространённой патологией в клинике ортопедической стоматологии является частичная адентия у пациентов проявляющаяся в виде дефектов зубных рядов различной локализации и протяжённости. Съёмные ортопедические конструкции в полости рта являются потенциальным местом адгезии и колонизации микроорганизмов. Целью исследования являлось изучение биоплёнок *Candida albicans* на поверхности базисных пластмасс съёмных ортопедических конструкций с применением сканирующей электронной микроскопии. Со слизистой оболочки полости рта пациентов на различных этапах проведения ортопедической реабилитации выделены и идентифицированы 175 культур грибов *C. albicans*. При изучении поверхности образцов пластмасс горячего и холодного типа полимеризации и биоплёнок *Candida* с помощью сканирующего электронного микроскопа JEOL JCM - 5700 (JEOL, Япония) установлены особенности формирования биоплёнки. Проведена оценка характера проявления гемагглютинирующей активности клинических штаммов грибов рода *Candida* в тесте гемагглютинации с эритроцитами человека I (O), II (A) группы крови человека и морской свинки. Суммарное количество гемагглютинирующих штаммов составило 37,14% с преобладанием удельного веса манонорезистентных (MRHA) культур - 23,43% случаев. Получены микрофотографии биоплёнки грибов *C. albicans* на поверхности пластмасс горячего и холодного типа полимеризации в динамике инкубирования. При сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) выявлены более выраженные изменения поверхности пластмасс горячего типа полимеризации по сравнению с пластмассой холодного типа при длительном инкубировании *C. albicans*, характеризующие разрыхление пластмассы и появление трещин на поверхности, отмечалось растрескивание биоплёнки гриба.*

**Ключевые слова:** биоплёнка; сканирующая электронная микроскопия; грибы; образцы пластмасс; съёмные протезы.

**Для цитирования:** Чеснокова М. Г., Чесноков В. А., Миронов А. Ю. Применение сканирующей электронной микроскопии с целью изучения биоплёнок *Candida albicans* на поверхности базисных пластмасс съёмных ортопедических конструкций. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5): 308-313.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-308-313>

Chesnokova M.G.<sup>1,2</sup>, Chesnokov V.A.<sup>3</sup>, Mironov A.Yu.<sup>4</sup>

## APPLICATION OF SCANNING ELECTRONIC MICROSCOPY FOR THE PURPOSE OF STUDYING *CANDIDA ALBICANS* BIOFILM ON THE SURFACE OF BASIC PLASTICS OF REMOVABLE ORTHOPEDIC DESIGNS

<sup>1</sup> Omsk State Medical University, Omsk State Medical University, 644099, Omsk, Russia;

<sup>2</sup> OmGTU HEI of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Omsk State Technical University, 644050, Omsk, Russia;

<sup>3</sup> BUZOO GSP No. 4, 644030, Omsk, Russia;

<sup>4</sup> FBUN Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology. G. N. Gabrichevsky Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia

*The most common pathology in the clinic of orthopedic dentistry is the presence of partial adentia in patients, manifested in the form of defects of dentition of various localization and length. Removable orthopedic structures in the oral cavity are a potential place for adhesion and colonization of microorganisms. The aim of the research was to study *Candida albicans* biofilms on the surface of base plastics of removable orthopedic structures using scanning electron microscopy. 175 cultures of *C. albicans* were isolated and identified from the oral mucosa of patients at various stages of orthopedic rehabilitation. When studying the surface of samples of plastics of hot and cold type polymerization and *Candida* biofilms using a JEOL JCM 5700 scanning electron microscope (JEOL, Japan), features of biofilm formation were established. An assessment of the nature of the manifestation of the hemagglutinating activity of clinical strains of *Candida* fungi in the hemagglutination test with human erythrocytes I (O), II (A) of the human and guinea pig blood groups was carried out.*

*The total number of hemagglutinating strains was 37.14%, with the prevalence of the proportion of manna-resistant (MRHA) cultures - 23.43% of cases. Micrographs of the *C. albicans* yeast-like biofilm biofilm were obtained on the surface of hot and cold-type plastics in incubation dynamics. Scanning electron microscopy revealed the most pronounced changes in the surface of hot plastics of polymerization compared to cold plastics with long incubation of *C. albicans*, which characterize the loosening of plastics and the appearance of cracks on the surface, and the cracking of a yeast-like fungus biofilm was noted.*

**Key words:** biofilm; scanning electron microscopy; fungi, plastic samples; removable dentures.

**For citation:** Chesnokova M. G., Chesnokov V. A., Mironov A. Yu. Use of scanning electron microscopy to study *Candida albicans* biofilms on the surface of base plastics of removable orthopedic constructions. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (5): 308-313 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-308-313>

**For correspondence:** Chesnokova M.G., Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology of the Ministry of Health of Omsk, Omsk State Medical University; e-mail: [chesnokova\\_marin@mail.ru](mailto:chesnokova_marin@mail.ru)

**Information about authors:**

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

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

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

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 19.01.2019

Accepted 20.02.2019

Наиболее распространённой патологией в клинике ортопедической стоматологии является частичная адентия у пациентов, проявляющаяся в виде дефектов зубных рядов различной локализации и протяжённости [1, 2]. Широко используемым средством ортопедической реабилитации является использование различных конструкций частичных съёмных протезов. Съёмные ортопедические конструкции в полости рта являются потенциальным местом адгезии и колонизации микроорганизмов [3–5]. Адгезивная активность представителей микробиоты полости рта отличается в зависимости от типа используемого базисного материала [6–9].

Базисные материалы, применяемые для съёмного протезирования в полости рта, должны соответствовать таким характеристикам как прочность, эластичность, обеспечивающих целостность протеза; достаточная твёрдость, низкая стираемость, безвредность для тканей полости рта и организма в целом [10; 11]. Базисные материалы в виде пластмасс являются полимерами, представляющими значительную группу высокомолекулярных соединений. При изготовлении ортопедических конструкций широкое применение получили акриловые пластмассы различных способов полимеризации. К первому типу материалов относят акриловые пластмассы горячего отверждения «Белакрил-М ГО», «Белакрил-Э ГО», материалы «Фторакс», «Этакрил-02», «Vertex Rapid Simplified».

Ко второму типу базисных материалов относят акриловые пластмассы холодного отверждения, это материалы «Белакрил-М ХО», «Белакрил-Э ХО», «Протарил-М», «Vertex-Castapress». Данный вид базисных материалов является более совершенным по сравнению с акрилатами горячей полимеризации, поскольку метод литьевого прессования имеет низкую экзотермическую реакцию при полимеризации, что позволяет уменьшить внутреннюю деформацию, снизить количество пор в базисе, улучшить прочность протеза [10, 12, 13]. Здоровые ткани находятся в динамическом равновесии с биохимическими процессами, служащими сохранению структуры тканей и поддерживающими их функцию. Применение ортопедических конструкций в полости рта способствует развитию и поддержанию дисбиоза с возникновением патологических процессов на слизистой оболочке полости рта [3, 4, 10].

Полость рта представляет идеальные условия для роста и размножения бактерий: рН, оптимальная температура, постоянное поступление питательных веществ в полость рта [1,11]. Особенностью микробной колонизации является

адгезивная способность бактерий и грибов по отношению к поверхности зубов, протезов, слизистой оболочки. Микроорганизмы могут проникать в толщину пластмассового базиса на глубину 1,5-2,5 мм и образовывать на поверхности протеза налёт, содержащий углеводы, клетки слущенного эпителия, лейкоциты, белки [3, 6, 12].

Адгезия играет главную роль при колонизации слизистых оболочек организма [13-17]. Исследования последних лет позволяют рассматривать адгезию как симбиотический фактор. Микроорганизмы, входящие в состав нормальной микрофлоры, участвуют в создании защитного барьера [18-20]. В процессе адгезии участвуют физические и физико-химические взаимодействия (электростатические, гидрофобные, водородные связи и др.), что свидетельствует о том, что данный процесс по своему характеру является сложным и включает неспецифические и специфические механизмы [21-24].

При длительном пользовании съёмными протезами микроорганизмы разрушают пластификаторы пластмасс, вызывая их распад и ухудшают свойства базисных материалов [10,11,25, 27].

При длительном ношении съёмных протезов происходит разрыхление пластмассы, появление внутренних напряжений, образование трещин и пор на их поверхности [10; 14]. Ортопедические конструкции, накапливая микрофлору, могут разрушаться микроорганизмами и продуктами их жизнедеятельности.

В научной литературе недостаточно изучены вопросы влияния грибов *C. albicans* на полимерные компоненты протезов [27, 28]. Различают биодеструкцию акриловых пластмасс двух типов. Первый тип биодеструкции, вызванной «старением» пластмассы. Старение акриловых материалов может привести к значительному увеличению адгезии *C. albicans* [2, 6, 11]. Существует разнообразный спектр адгезинов гриба, к которым относят поверхностные белки, «интегриноподобные» протеины, поверхностные гликопротеиды, полисахариды, фимбрии-маннопротеины, углеводные части маннопротеинов клеточной стенки. Адгезины гриба участвуют в адгезии к эпителиоцитам хозяина, инертным поверхностям материалам, в том числе полимерным.

При втором типе биодеструкции пластмассы съёмных протезов в результате влияния комплекса факторов происходит поглощение воды, разрыхление пластмассы, возникновение внутренних напряжений, образование пор с последующей адгезией, колонизацией микроорганизмами и образованием микробного налёта [1, 3].

Ведущим этиологическим фактором стоматита, вызванного ношением съёмного зубного протеза являются грибы рода *Candida*. *C. albicans* выделяет аспаргат-протеиназу, которая способствует активному росту грибов на поверхности ортопедических конструкционных материалов. Исследованиями последних лет установлено, что патогенность *C. albicans* является мультифакторной. Среди факторов патогенности грибов выявлены фосфолипазы, кислые протеазы, способные маскировать рецепторы к компонентам комплемента и опсонинам [4, 18, 19]. Ведущим фактором патогенности *C. albicans*, вызывающим деструкцию тканей, является фермент аспаргат протеиназа, который обеспечивает инвазию грибов в ткани [19, 29, 30].

Представлял интерес изучение биоплёнок *C. albicans* на поверхности базисных пластмасс съёмных ортопедических конструкций с применением сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

**Материал и методы.** Проведено когортное исследование, обследованы пациенты с частичной адентией возрастом 55-70 лет. Критерии включения - наличие показаний к изготовлению съёмных протезов, отсутствие острых воспалительных и хронических заболеваний в стадии декомпенсации. Критерии исключения пациентов - отказ пациентов от участия в исследовании, наличие психических заболеваний, злокачественных новообразований. Со слизистой оболочки полости рта пациентов на различных этапах проведения ортопедической реабилитации выделены и идентифицированы культуры грибов рода *Candida* вида *C. albicans*. Грибы идентифицировали микроскопически и биохимическими тестами. Для идентификации использованы хромогенные среды «CandiSelect 4» (Bio-Rad) и коммерческие тест-системы, основанные на исследовании ауксаногаммы: «Auchasolog 2» (Bio-Rad). Осуществляли тест формирования ростковых трубок.

Оценка выраженности адгезивных свойств клинических штаммов грибов рода *Candida* осуществлялась с помощью реакции бактериальной гемагглютинации по J.P. Duquid и соавт. в модификации (1984) с эритроцитами человека I (0), II (A) группы крови человека и морской свинки. Тест проводили с эритроцитами морской свинки, I (0) и II (A) группы крови человека в отсутствие и присутствии 2,5% раствора D-маннозы. При регистрации учитывалось наличие адгезивной активности грибов и характер гемагглютинации – маннозочувствительная (MSHA) или маннозоустойчивая (MRHA).

В соответствии с дизайном исследования культуру грибов (*C. albicans*) и кусочки образцов пластмасс горячего типа полимеризации (полиметилметакрилата) «Фторакс» ТУ 64-2-120-82 («АО Стома, Украина») и холодного типа полимеризации «Villacryl SP» (Zhermack-Италия), культивировали в питательной среде, имитирующей ротовую жидкость, при температуре 30°С в различные периоды (в течение 1 нед, 14 дней, 1,5 мес). Образцы базисных пластмасс после инкубирования с культурой *C. albicans* фиксировали по методу Ito-Karnovsky.

Исследование поверхности образцов пластмасс проводили методом СЭМ с использованием сканирующего электронного микроскопа JEOL JCM - 5700 (JEOL, Япония) в режимах высокого, низкого вакуума при ускоряющих напряжениях 5, 10, 20 кВ. Съёмка поверхности образцов пластмасс на увеличениях в диапазоне от x40 до x20000 крат. При исследовании образцов базисных пластмасс с целью изучения биоплёнок получены 57 микрофотографий биоплёнки на поверхности пластмасс

горячего и холодного типа полимеризации.

Для оценки подповерхностных изменений базисных пластмасс под действием грибов производилась резка ионным (галлиевым) пучком опытных образцов в сканирующем электронном микроскопе JEOL JCM - 5700 (JEOL, Япония). На поверхности опытных образцов выбирались участки с массивным слоем образовавшейся биоплёнки.

**Результаты.** Со слизистой оболочки полости рта пациентов выделены и идентифицированы 175 культур *C. albicans* на различных этапах проведения ортопедической реабилитации.

Оценка характера проявления гемагглютинирующей активности клинических штаммов *C. albicans*, выделенных со слизистой оболочки полости рта пациентов на этапах ортопедической реабилитации показала выраженную адгезивную способность штаммов, вызывающих гемагглютинацию эритроцитов человека I (0) группы крови и морской свинки в сравнении со штаммами, агглютинирующими эритроциты человека II (A) группы крови человека (рис. 1).

Суммарное количество гемагглютинирующих штаммов составило 37,14% с преобладанием удельного веса маннозорезистентных (MRHA) культур - 23,43% случаев. Отмечалось преобладание удельного веса штаммов, вызывающих гемагглютинацию эритроцитов человека I (0) группы крови и морской свинки, в сравнении со штаммами, агглютинирующими эритроциты человека II (A) группы крови человека  $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ .

Выбран штамм, обладающий наиболее выраженной (MRHA) маннозорезистентной гемагглютинацией с эритроцитами человека I (0) группы крови и морской свинки.

Через 2 нед инкубации поверхность образцов пластмассы горячего типа полимеризации покрывалась сплошной зрелой биоплёнкой *C. albicans* (рис. 2, а). Микрофотография биоплёнки *C. albicans* на пластмассе горячего типа полимеризации при большем увеличении демонстрирует клетки гриба различных размеров (рис. 2, б).

При длительной инкубации через 1,5 мес при СЭМ на поверхности образцов пластмассы горячего типа полимеризации регистрировалась биоплёнка *C. albicans*, характеризующаяся зрелостью, имеющая наплывы и растрескивания (рис. 2, в).

На фоне сформированной на поверхности пластмассы биоплёнки видны образовавшиеся углубления раз-



Рис. 1. Гемагглютинирующая активность клинических штаммов *C. albicans*.

По оси абсцисс - группы (штаммы, обладающие гемагглютинирующей активностью, штаммы маннозорезистентные (MRHA), штаммы, проявлявшие маннозорезистентную (MRHA) и маннозочувствительную гемагглютинацию (MSHA), по оси ординат - процент (%).

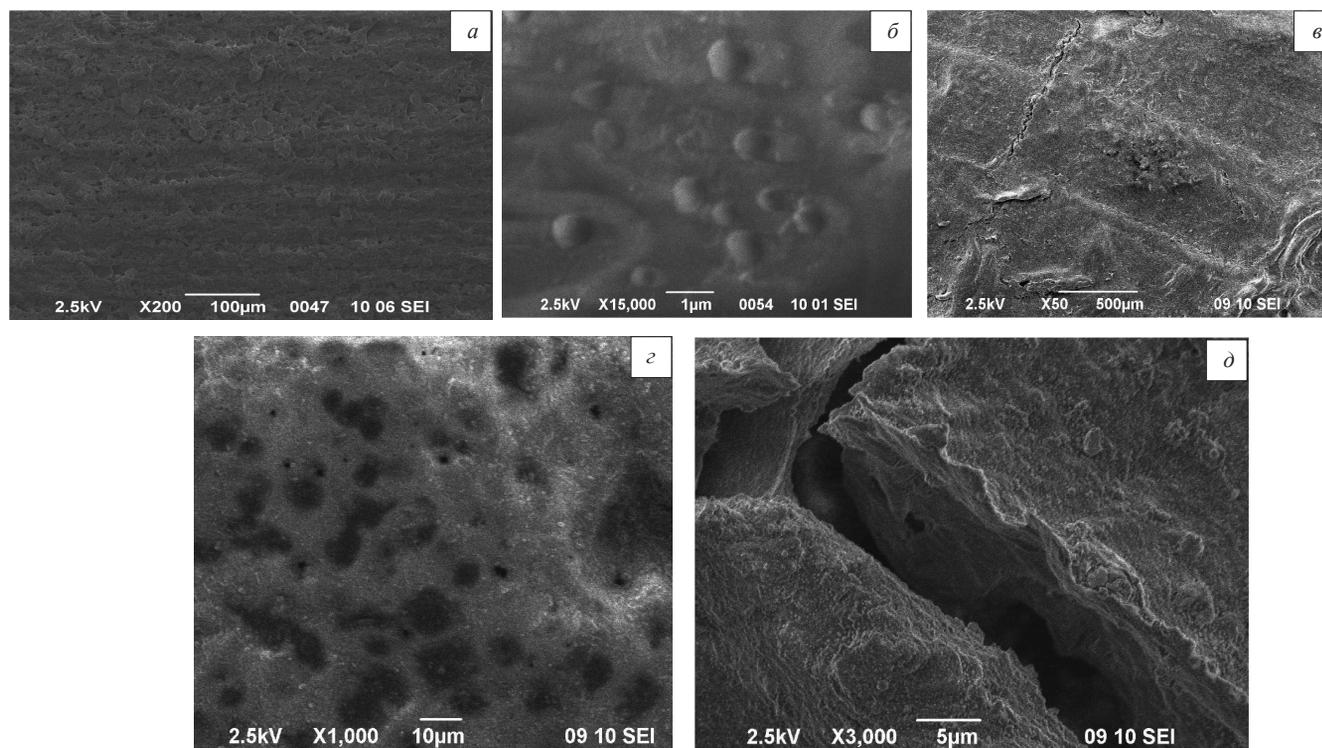


Рис. 2. Биоплёнка *C. albicans* на пластмассе горячего типа полимеризации. СЭМ.

*a* – биоплёнка на поверхности пластмассы инкубация 2 нед.; *б* – биоплёнка при большем увеличении. Видны клетки гриба различных размеров; *в* – биоплёнка через 1,5 мес инкубации. Видны наплывы, растрескивание биоплёнки; *г* – биоплёнка на поверхности пластмассы через 1,5 мес инкубации, видны образовавшиеся углубления различной величины, имеющие в некоторых местах сливной характер, образование пористости; *д* – поверхностные и подповерхностные изменения пластмассы при длительном культивировании *C. albicans*. Крупные трещины, разрушение пластмассы на фоне биоплёнки через 1,5 мес инкубации *C. albicans*, массивный экзоклеточный матрикс, различные морфоварианты биоплёнки.

личной величины, имеющие в некоторых местах сливной характер, отмечено образование пористости (рис. 2, *г*). Микрофотография демонстрирует наличие поверхностных, подповерхностных и глубоких изменений образцов пластмассы горячего типа полимеризации при длительном культивировании *C. albicans* (рис. 2, *д*). Отчетливо видны образовавшиеся крупные трещины, визуализация каверн в толще пластмассы, выявляемая по ходу трещин, разрушение пластмассы горячего типа полимеризации на фоне биоплёнки, массивный экзоклеточный матрикс, различные морфоварианты биоплёнки.

На рис. 3, *a-в* видна сформированная биоплёнка *C. albicans* на пластмассе холодного типа полимеризации, характер поверхностных изменений пластмассы в различные периоды культивирования. СЭМ показывает формирование биоплёнки *C. albicans* на пластмассе холодного типа полимеризации при инкубации в течение 2 нед. На микрофотографиях видна сформированная зрелая биоплёнка на поверхности пластмассы, присутствуют морфовары её элементов различной величины. На поверхности отмечаются поверхностные дефекты в виде отдельных углублений в пластмассе. В сравнении с деструктивными дефектами, выявленными на поверхности образцов пластмассы горячего типа полимеризации, их характер менее выражен.

При длительном культивировании грибов на поверхности пластмассы горячего типа полимеризации происходят выраженные поверхностные и подповерхностные изменения, характеризующиеся формированием углу-

блений различной конфигурации, которые отмечались на фоне сплошной биоплёнки, выявлены различные морфоварианты биоплёнки, отмечено образование трещин различной величины, наличие внутренних каверн, полостей. Биоплёнки, сформированные на поверхности пластмассы горячего типа полимеризации имели массивный экзоклеточный матрикс. Указанные дефектные изменения пластмассы отсутствуют в образцах холодного типа полимеризации после длительного культивирования, где обнаружены на фоне сплошной биоплёнки поверхностные дефекты в виде отдельных углублений в пластмассе.

**Обсуждение.** Проведённые исследования позволяют установить особенности формирования биоплёнки грибов на поверхности пластмасс горячего и холодного типа полимеризации, определить уровень, выраженность, массивность характера изменений поверхности базисных пластмасс, в результате биодеструкции, обусловленной длительной колонизацией *C. albicans*. *C. albicans* может вызывать более выраженные деструктивные изменения на поверхности пластмасс горячего типа полимеризации по сравнению с пластмассами холодного типа полимеризации, что можно объяснить особенностями физических свойств поверхности, физико-химических свойств конструкционных материалов базисных протезов горячего и холодного типа полимеризации, характером адгезивной способности *C. albicans* к поверхности зубных протезов.

Микодеструктивные изменения пластмасс при длительном культивировании характеризовались появлением дополнительных дефектов поверхности и увеличе-

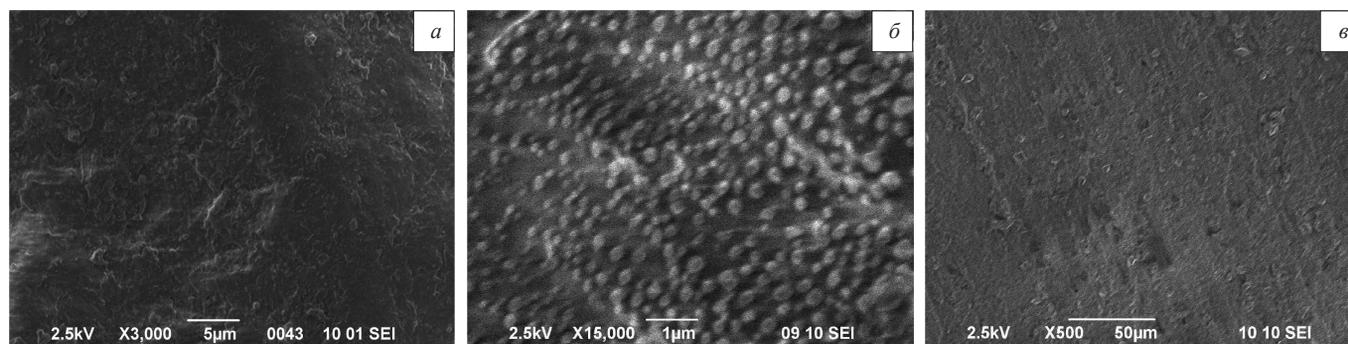


Рис. 3. Биоплёнка *C. albicans* на пластмассе холодного типа полимеризации. СЭМ.

*a* – биоплёнка на поверхности пластмассы инкубация 2 нед.; *б* – морфовары клеток различной величины инкубация 2 нед.; *в* – зрелая биоплёнка на поверхности пластмассы, образование отдельных углублений в пластмассе инкубация 1,5 мес.

нием размеров имеющихся разрушений. Формирование биоплёнки *C. albicans* может способствовать возникновению стойких и постоянных очагов персистенции грибов на слизистой оболочке полости рта пациентов на различных этапах ортопедической реабилитации.

**Заключение.** Установлены различия формирования биоплёнки *C. albicans* на поверхности базисных материалов горячего и холодного типов полимеризации при изучении образцов с помощью СЭМ.

Выявлены более выраженные изменения поверхности пластмасс горячего типа полимеризации по сравнению с пластмассой холодного типа при длительном инкубировании культуры *C. albicans*.

После 1,5 мес. инкубации при проведении СЭМ на поверхности базисного материала горячего типа полимеризации регистрируются дефекты материала в виде значительных трещин, отсутствующих в образцах пластмассы холодного типа полимеризации.

Через 2 нед., 1,5 мес. инкубации при изучении биоплёнки *C. albicans* с помощью СЭМ на пластмассе горячего типа полимеризации отмечено формирование зрелой сплошной биоплёнки, растрескивание её в отдельных местах, визуализированы её различные морфоварианты.

В образцах пластмассы горячего типа полимеризации спустя 1,5 мес. инкубации *C. albicans* появлялись углубления различной степени выраженности и массивности. На поверхности пластмассы холодного типа полимеризации встречались отдельные незначительные углубления.

На пластмассе холодного типа полимеризации биоплёнка грибов образовывалась без наличия трещин по сравнению с пластмассой горячего типа полимеризации.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 5—9, 13, 15, 17, 20-27 см. REFERENCES)

1. Арутюнов А.С., Царёв В.Н., Кравцов Д.В., Комов Е.В. Сравнительный анализ адгезии микробной флоры рта к базисным материалам челюстных протезов на основе полиуретана и акриловых пластмасс. *Российский стоматологический журнал*. 2011;1: 19–23.
2. Ибрагимов Т.И., Царёв В.Н., Хан А.В. Изучение первичной адгезии штаммов пародонтопатогенных бактерий и дрожжеподобных грибов к материалам, используемым для изготовления

индивидуальных защитных спортивных кап. *Российский стоматологический журнал*. 2012;2: 4–6.

3. Сафаров А.М. Микробная обсеменённость полости рта при ношении съёмных зубных протезов на основе различных материалов. *Современная стоматология*. 2010;2: 103–5.
4. Чесноков В.А., Чеснокова М.Г. Микробиота слизистой оболочки полости рта и поверхности съёмных акриловых пластиночных протезов при ортопедической реабилитации. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(2): 126–8.
10. Саливончик М.С., Каливрадзиян Э.С., Рыжова И.П. Результаты микроскопии базисных полимеров. *Современная ортопедическая стоматология*. 2014;22: 66–7.
11. Сафаров А.М., Гурбанова С.Ф. Микробиологические особенности протезных стоматитов у лиц, пользующихся съёмными протезами на основе «фторакса» и «литьевого термопласта медицинской чистоты». *Проблемы медицинской микологии*. 2010;12(4): 31–4.
12. Арутюнов С.Д., Царёв В.Н., Ипполитов Е.В., Апресян С.В. Формирование биоплёнки на временных зубных протезах: соотношение процессов первичной микробной адгезии, коагрегации и колонизации. *Стоматология*. 2012; 91: 5–10.
14. Rostoka D., Kroiča I., Kuznetsova V. *Candida albicans* adhesion to plastics during correction of removable dentures. *Stomatologia*. 2004; 83(5): 14–6.
16. Тец В.В., Тец Г.В. Микробные биоплёнки и проблемы антибиотикотерапии. *Практическая пульмонология*. 2013; 4: 60–4.
18. Чепуркова О.А., Чеснокова М.Г., Недосеко В.Б. Выбор антимикотических препаратов, используемых в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита, осложнённого дрожжеподобными грибами рода *Candida* spp. *Клиническая стоматология*. 2008; 1 (45): 32–5.
19. Чепуркова О.А., Чеснокова М.Г., Недосеко В.Б., Миронов А.Ю. Кандида-ассоциированный пародонтит. Диагностика, лечение. Омск: Вариант-Омск; 2012.
28. Автандилов Г.А. Ультраструктурное исследование процесса взаимодействия *Staphylococcus aureus* с полиуретаном. *Dental forum*. 2011; 3: 11–2.
29. Лисовская С.А., Глушко Н.И., Халдеева Е.В. Адгезивные свойства штаммов *Candida albicans* при кандидозах различной локализации. *Проблемы медицинской микологии*. 2007; 9(1): 26–9.
30. Leonov V.V., Mironov A.Yu., Bulatov I.A., Pachganov S.A., Leonova L.V. On the question of the nature of hemolytic activity of *Candida albicans*. *BioNanoScience*. 2018; 8(1): 446–9.

#### REFERENCES

1. Arutyunov A.S., Tsarev V.N., Kravtsov D.V., Komov E.V. Comparative analysis of the adhesion of the microbial flora of the mouth to the base materials of the jaw prostheses based on polyurethane and acrylic plastics. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal*. 2011;1: 19–23. (in Russian)
2. Ibragimov, T.I., Tsarev V.N., Khan A.V. Study of the primary adhesion of the periodontal pathogenic bacteria and yeast strains to the material used for the manufacture of individual protective sports caps. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal*. 2012; 2: 4–6. (in Russian)
3. Safarov A.M. Microbial contamination of the oral cavity when

- wearing removable dentures based on various materials. *Sovremennaya stomatologiya*. 2010; 2: 103–5. (in Russian)
4. Chesnokov V.A., Chesnokova M.G. Mycobiota of the oral mucosa and the surface of removable acrylic laminar prostheses for orthopedic rehabilitation. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(2): 126–8. (in Russian)
  5. Yildirim M.S., Hasanreisoglu U., Hasirci N., Sultan N. Adherence of *Candida albicans* to glow-discharge modified acrylic denture base polymers. *J. Oral. Rehabil.* 2005; 32(7): 518–25.
  6. Nevzatoğlu E.U., Ozcan M., Kulak-Ozkan Y., Kadir T. Adherence of *Candida albicans* to denture base acrylics and silicone-based resilient liner materials with different surface finishes. *Clin. Oral. Investig.* 2014; 11(3): 231–6.
  7. Robert R., Nail S., Marot-Leblond A. Adherence of platelets to *Candida species* in vivo. *Infect. Immun.* 2000; 68(2): 570–6.
  8. Miyauchi M., Giummelly P., Yazawa S., Okawa Y. Adhesion of *Candida albicans* to HeLa cells: studies using polystyrene beads. *Biol. Pharm. Bull.* 2007; 30(3): 588–90.
  9. Tang G., Samaranyake L.P., Yip H.K. Direct detection of *Actinomyces spp.* from infected root canals in a Chinese population: a study using PCR-based, oligonucleotide-DNA hybridization technique. *J. Dent.* 2013; 31(8): 559–68.
  10. Salivonchik M.S., Kalivradzhiyan E.S., Ryzhova I.P. The results of the microscopy of basic polymers. *Sovremennaya ortopedicheskaya stomatologiya*. 2014; 22: 66–7. (in Russian)
  11. Safarov A.M., Gurbanova S.F. Microbiological features of prosthetic stomatitis in persons using removable prostheses based on «for-aksa» and «injection molding thermoplastic of medical purity». *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2010; 12(4): 31–4. (in Russian)
  12. Arutyunov S.D., Tsarev V.N., Ippolitov E.V., Apresyan S.V. Biofilm formation on temporary dentures: the ratio of the processes of primary microbial adhesion, coaggregation and colonization. *Stomatologiya*. 2012; 91: 5–10. (in Russian)
  13. Carlén A., Olsson J., Ramberg P. Saliva mediated adherence, aggregation and prevalence in dental plaque of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces spp.* in young and elderly humans. *Arch. Oral. Biol.* 1996; 41(12): 1133–40.
  14. Rostoka D., Kroïcha I., Kuznetsova V. *Candida albicans* adhesion to plastics during correction of removable dentures. *Stomatologiya*. 2004; 83(5): 14–6. (in Russian)
  15. Klotz SA., Gaur NK., De Armond R. *Candida albicans* als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. *Med. Mycol.* 2007; 45(4): 363–70.
  16. Tets V.V., Tets G.V. Microbial biofilms and antibiotic problems. *Prakticheskaya pul'monologiya*. 2013; 4: 60–4. (in Russian)
  17. Sohn K., Senyürek I., Fertey J. An in vitro assay to study the transcriptional response during adherence of *Candida albicans* to different human epithelia. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6(7): 1085–93.
  18. Chepurkova O.A., Chesnokova M.G., Nedoseko V.B. The choice of antimycotic drugs used in the complex treatment of chronic generalized periodontitis, complicated by yeast-like fungi of the genus *Candida* spp. *Klinicheskaya stomatologiya*. 2008; 1 (45): 32–5. (in Russian)
  19. Chepurkova O.A., Chesnokova M.G., Nedoseko V.B., Mironov A.Yu. *Candida* associated parodontitis. Diagnostics. Treatment [Kandida-assotsiirovannyi parodontit. Diagnostika, lechenie]. Omsk: Omsk-Variant; 2012. (in Russian)
  20. Samaranyake Y.H., Samaranyake L.P., Pow E.H. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9): 296–302.
  21. Al-Ahmad A., Wiedmann-Al-Ahmad M., Carvalho C. Bacterial and *Candida albicans* adhesion on rapid prototyping-produced 3D-scaffolds manufactured as bone replacement materials. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2008; 28(3): 453–5.
  22. Johann S., Soldi C., Lyon J.P. Antifungal activity of the amyirin derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 2007; 45(2): 148–53.
  23. Sen B.H., Chugal N.M., Liu H., Fleischmann J. A new method for studying the adhesion of *Candida albicans* to dentin in the presence or absence of smear layer. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 2003; 96(2): 201–6.
  24. Dunny M.W. Bacterial adhesion: seen any good biofilm lately? *Clin. Microbiol.* 2002; 15: 155–66.
  25. Otten J.E., Wiedmann-Al-Ahmad M., Jahnke H., Pelz K. Bacterial colonization on different suture materials - a potential risk for intraoral dentoalveolar surgery. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2005; 74(1): 627–35.
  26. Holmes AR., Wielen P., Cannon R.D. *Candida albicans* binds to saliva proteins selectively adsorbed to silicone. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2006; 102(4): 488–94.
  27. Pereira-Cenci T., Cury A.A., Cenci M.S., Rodrigues-Garcia RC. In vitro *Candida* colonization on acrylic resins and denture liners: influence of surface free energy, roughness, saliva, and adhering bacteria. *Int. J. Prosthodont.* 2012; 20(3): 308–10.
  28. Avtandilov G.A. Ultrastructural study of the interaction of *Staphylococcus aureus* with polyurethane. *Dental forum*. 2011; 3: 11–2. (in Russian)
  29. Lisovskaya S.A., Glushko N.I., Khaldeyeva E.V. Adhesive properties of *Candida albicans* strains in candidiasis of various localization. *Problemy meditsinskoy mikologii*. 2007; 9(1): 26–9. (in Russian)
  30. Leonov V.V., Mironov A.Yu., Bulatov I.A., Pachganov S.A., Lenonova L.V. On the question of the nature of hemolytic activity of *Candida albicans*. *BioNanoScience*. 2018; 8(1): 446–9.

Поступила 19.01.19  
Принята к печати 20.02.19

Лахтин В. М., Лахтин М. В., Миронов А. Ю., Алёшкин В. А., Афанасьев С. С.

## ЛЕКТИНОВЫЕ ПОПУЛЯЦИИ НК-КЛЕТОК ПРОТИВ ВИРУССОЦИИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

*Проведён анализ НК-клеток человека в связи с вирусассоциированными опухолями. В регуляции врождённого иммунитета важную роль играют распознающие полисахариды, гликоконъюгаты, гликопаттерны белки неиммуноглобулиновой природы и их комплексы - рецепторные лектины. Разнообразие популяций НК-клеток, в которых лектины функционируют с другими рецепторами, направлено на опухоли и вирусы. Эффективность и избирательность действия популяций НК-клеток может быть повышена в кооперации с адаптивным иммунитетом. Оценены встречаемость, перераспределение, в том числе под влиянием цитокинов, роль в организме лектиновых популяций НК-клеток, осуществляющих межклеточные взаимодействия и противоопухолевый иммунитет. Указано на широкие перспективы лектиновых и других доминирующих популяций НК-клеток сети врождённого иммунитета, являющихся основными в межклеточных взаимодействиях при реализации защиты организма в кооперации с клеточным и гуморальным иммунитетом. Взаимодействие (Cross-Talk) ключевых популяций НК-клеток, действующих в соответствии с механизмами гуморального иммунитета, является неразрывным постоянным и длительным (важным при терапии хронической патологии), обеспечивающим построение востребованных сочетанных противоопухолевых и противовирусных цитокиновых и цитотоксических ответов, что соответствует принципу действия «сеть-в-сети». Влияние на сеть НК-клеток лектиновых, Ig-подобных, цитотоксических, других регуляторных рецепторов и их лигандов (в том числе через перераспределение продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками) перспективно для формирования в организме ранних продолжительных противоопухолевых и противовирусных процессов различного типа. Следует учитывать CD-разнообразие рецепторов лектиновых, Ig-подобных и других популяций НК-клеток с различным онтогенезом, вести поиск ключевых популяций НК-клеток у пациентов с целью отбора и конструирования оптимальных для него (контингента пациентов в эпидемиологически значимых случаях) лечебных и профилактических популяций НК-клеток (типа вариантов CAR-T). Указано на перспективы популяций НК-клеток в разработке новых противоопухолевых, противовирусных, вакцинных стратегий, препаратов и режимов их применения. К перспективным лигандам относятся пробиотические лектины.*

**Ключевые слова:** взрослые; дети; цитомегаловирус (CMV); вирус Эпштейна-Барра (EBV); вирус иммунодефицита (HIV-1); вирус гепатита-C (HCV); дисбиоз; острая лейкемия; В-клеточные лимфомы; лимфомы Беркита; гепатоклеточные карциномы (HCC); саркомы; рецепторные лектины; гликоконъюгаты; врождённый иммунитет; мукозальный иммунитет; киллерные Т-лимфоциты (НК-клетки); популяции НК-клеток; моноциты; межклеточные взаимодействия; В-лимфоциты; Т-лимфоциты; цитокины; противоопухолевые стратегии; антивирусные стратегии; DNA damage response (DDR); пробиотические лектины.

**Для цитирования:** Лахтин В. М., Лахтин М. В., Миронов А. Ю., Алёшкин В. А., Афанасьев С. С. Рецепторные лектины против вирусассоциированных опухолей (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (5): 314-320. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-314-320>

Lakhtin V. M., Lakhtin M. V., Mironov A. Yu., Aleshkin V. A., Afanasiev S. S.

### LECTIN POPULATIONS OF NK CELLS AGAINST VIRUSES-ASSOCIATED TUMORS (REVIEW OF LITERATURE)

G. N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology & Microbiology, 125212, Moscow, Russia

*Analysis of the human NK (natural killers) cells and their functionally different populations in connection to tumor processes accompanied with viral infections is presented. Receptor lectins (non-immunoglobulin proteins and their complexes recognizing polysaccharides, glycoconjugates and glycopattern-containing molecules) play important role in regulation of innate immunity. Communicative diversity of NK-cell populations (in which lectins cofunction to other receptors) is directed against tumors and viruses. Effectiveness and selectivity of action of NK cell populations can be increased in cooperation together with adaptive immunity. Evaluations of occurrence, redistribution (also under influence of cytokines) and contribution of NK-populations (depending on lectin receptors recognition coupled to multifunctions of receptors) in respect of increasing antitumor and antiviral immune responses are given.*

*The data indicate extended prospects of lectin receptors (coupled to other type receptors) containing NK populations of the network compartment of innate immunity upon realization of different variants of organism protection in cooperation with cellular and humoral immunity. Such NK populations are the basis for further intercellular interactions. Innate immunity Cross-Talk, involving the leader NK cell populations acting according to humoral immunity mechanisms, acts on duty regime (importance for therapy of chronic pathology) that results in providing optimal combined antitumor and antiviral cytokine and cytotoxic responses according to the principle of action as «network-in-network». The influence network of lectin, Ig-like, cytotoxic, other regulator NK populations (also through redistribution of production of cytokines by immunocompetent cells) is perspective for forming early prolonged antitumor and antiviral processes of different types in organism.*

*It is of importance to consider CD diversity of receptor repertuar of lectin, Ig-like and other NK populations revealing different ontogenesis as well as to seach patient key NK-populations to select and construct personally (or for contingents in cases of epidemiological significance) optimal therapeutic/prophylactic NK populations (like variants of CAR-T).*

*Aforementioned data indicate perspectiveness of NK cell populations in development of new antitumor/antiviral effective and selective vaccine strategies, preparations and regimes of their applications. Probiotic lectins reveal features of perspective ligands cofunctioning to network of NK cell populations.*

**Key words:** adults, children, cytomegalovirus (CMV); DNA damage response (DDR); dysbiosis; Epstein-Barr virus (EBV); human immunodeficiency virus (HIV-1); hepatitis C virus (HCV); acute leukemia; B cell lymphomas; Burkitt lymphoma; hepatocellular carcinomas (HCC); sarcomas; C-type lectins (CLR); innate immunity; mucosal immunity; killer T-lymphocytes; NK cells; monocytes; dendritic cells (DC); macrophages; intercellular communications; cytokines; antitumor strategies; antiviral strategies; probiotic lectins.

**For citation:** Lakhtin V. M., Lakhtin M. V., Mironov A. Yu., Aleshkin V. A., Afanasiev S. S. Lectin populations of NK cells against tumors coupled to viral infections (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (5): 314-320. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-5-314-320>

**For correspondence:** Mironov A. Yu., Dr. Sci. Med., Professor, Head of the department for microbiology; e-mail: andy.60@mail.ru

**Information about authors:**

Lakhtin V. M. <http://orcid.org/>  
Lakhtin M. V. <http://orcid.org/>  
Mironov Andrey Yu. <http://orcid.org/0000-0002-8544-5230>  
Aleshkin V. A. <http://orcid.org/>  
Afanasiev S. S. <http://orcid.org/>

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

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

Received 21.01.2019  
Accepted 20.02.2019

Растёт интерес к врождённому иммунитету, неразрывно связанному с адаптивным иммунитетом и обуславливающим дополнительную защиту организма [3,13,16,24]. Межклеточные взаимодействия врождённого иммунитета с участием популяций NK (*natural killers*)-клеток привлекают особое внимание в связи с их антимикробным, противовирусным, противоопухолевым потенциалом. В регуляции гуморально-иммунитета важную роль играют распознающие паттерны рецепторы, к которым относятся рецепторные лектины (РЛ) С-типа [Ca<sup>2+</sup>-зависимые], распознающие паттерны углеводов и гликоконъюгатов (ГК) [3, 4].

Разнообразие РЛ с различной специфичностью к ГК-паттернам, являющихся биомаркерами субпопуляций иммунокомпетентных клеток, используется в стратегиях против вирусов, бактерий, грибов, простейших, гельминтов, опухолей системы кроветворения (лейкемий, лимфом, миелом), солидных опухолей (рак яичников, шейки матки, простаты, мочевого пузыря, поджелудочной железы, кишечника, печени, почек, молочной железы, кожи и др.) [3, 4]. Описаны опухоли человека, вызываемые вирусами. До 2% новообразований в мире связано с вирусом Эпштейна-Барра (EBV) [25].

Роль распознающих гликопаттерновые мишени популяций NK-клеток при опухолях, индуцированных вирусами, остается недостаточно исследованной [3, 4].

Следует оценить роль лектиновых популяций NK-клеток в сочетании с другими иммунокомпетентными клетками против опухолей, вызванных вирусами.

**Вирусы, опухоли, РЛ, популяции NK-клеток, рассмотренные в обзоре.** К онкогенным вирусам относятся аренавирусы: вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), герпесвирусы: цитомегаловирус (CMV), вызывающий острую лейкемию, В-клеточные лимфомы, системные инфекции с другими вирусами; EBV, вызывающий инфекционный мононуклеоз, назофарингеальную карциному, лимфому Беркита [6, 25]; паповавирусы: папилломавирусы человека (HPV), вызывающие рак шейки матки; поксвирусы: вирус оспы коровы, вирус оспы мышей, осповакцины (VACV) [16, 24]; ретровирусы: вирус иммунодефицита человека (HIV-1 и 2), вызывающий лимфомы и в ассоциации CMV прогрессирование ВИЧ-инфекции, флавивирусы: вирус гепатита С (HCV), вызывающий гепатоклеточную карциному; вирус гепатита В (HBV) и вирус гепатита δ (HDV), вызывающий

карциному печени [22]; тогавирусы: вирус чикунгунья, вызывающий саркому [21].

**Разнообразие, онтогенез, экспрессия антигенов у лектиновых популяций NK-клеток, роль лектиновых популяций NK-клеток в гуморальном иммунитете.** РЛ типа NKG<sub>2</sub> - трансмембранные гликопротеины II типа, кодируемые на 12 хромосоме человека. Гены CD<sub>94</sub> и NKG<sub>2</sub> кластеризованы в NK-генном комплексе (NKC) в хромосомном генном кластере 12p12-p13, связанным с функционированием гетеродимерных CD<sub>94</sub>NKG<sub>2</sub>-рецепторов, кодирующем лектиновый внеклеточный и цитоплазматический домены, иницирующие взаимодействие NK-клеток и субпопуляций Т-клеток. Лектины подсемейства активизирующих рецепторов NKG<sub>2D</sub> экспрессируются на NK-клетках, NK-Т-клетках (NKT), субпопуляциях γδ<sup>+</sup>-Т-клеток (табл. 1), активированных CD<sub>8</sub><sup>+</sup>-клетках (возможен синергизм с системой комплемента человека [18]), ряде аутореактивных CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-клеток и других иммунокомпетентных клетках [37]. Противоопухолевый и противовирусный иммунный ответ запускают популяции миелоидных клеток, моноцитов, NK-клеток, регулируемые посредством МНС-класс-I-молекул. NK-клетки подсемейства РЛ NKG<sub>2</sub> представлены лектинами и их производными в составе NKG<sub>2A/B/C/D/E/H</sub>. A, B, D - ингибиторы определённых межклеточных путей (через ITIM в РЛ, влияющих на SHP<sub>1</sub>-Туг-фосфатазу); C, F, E, H - активаторы других межклеточных путей (с участием ITAM-несущих адаптерных белков DAP<sub>12</sub> и DAP<sub>10</sub>, передачу сигнала через зависимые от протеин-Туг-киназы пути метаболизма) [4, 9, 10, 13, 24].

Разнообразие лектиновых популяций NK-клеток обусловлено экспрессией генов NKG<sub>2</sub>, KIR, NKp (природных цитотоксических рецепторов NCR), CD на клетках и различием фенотипов взаимодействующих молекул, в том числе в составе ди- и олигомерных гомо- и гетероструктур, подобных CD<sub>94</sub>NKG<sub>2</sub>, тетрамерным HLA-E и генетических вариантов РЛ (мультиаллельных типа NKG<sub>2C1/2/3</sub>; фенотипа NKG<sub>2E</sub> в виде двух альтернативных сплайсинговых форм NKG<sub>2E</sub> и NKG<sub>2H</sub> [24], постепенно проявляющихся в условиях постгеномных изменений, при конструировании генетических химерных продуктов: укороченных (NKG<sub>2C</sub> - С-концевая укороченная форма NKG<sub>2C3</sub>); внеклеточных, трансмембранных, внутриклеточных доменов РЛ (NKG<sub>2F</sub> экспрессирующегося только как внутриклеточная форма), продуктов генетических карт контактов CD<sub>94</sub>-NKG<sub>2</sub> [10, 24, 35, 36].

В модуляции HLA-класса-I собственных для организма молекул участвуют рецепторы  $\text{NKG}_2$  и KIR (киллерные Ig-подобные рецепторы) NK-клеток и их лиганды. Лиганды располагаются на различных клетках-партнерах, растворимые лиганды на тех же клетках, что и рецепторы [24,37]. Сигналы, возникающие при взаимодействии между рецепторами  $\text{CD}_{94}^+\text{NKG}_2^+$  (или KIR) и MHC-класс-I-гликопротеинами в ответ на появление в организме аномальных паттерновых лигандов регулируют активность популяций NK-клеток. Различия взаимодействий, реализация памяти NK-клеток генетически предопределено. Геном млекопитающих характеризуется умеренно разнообразными генами  $\text{NKG}_2$  на фоне высоко вариабельных генов KIR [35]. Полиморфизм гена  $\text{NKG}_{2D}$  обеспечивает NK-клеточную цитотоксичность, например, в связи с восприимчивостью к раку, вызванному HPV [11]. У человека прогрессирует развитие ограниченных функций системы MHC-E/ $\text{NKG}_2$  на фоне расширения функций системы MHC-I/KIR [35]. В зараженных вирусами клетках, как в случае CMV, экспрессия классического лейкоцитарного антигена человека HLA-класса-I резко снижается при участии ингибиторных KIR-рецепторов, а неклассического антигена HLA-E (экспрессирован на опухолевых клетках, служит участком связывания РЛ) устойчива, поддерживается активирующими  $\text{NKG}_2$ -рецепторами [8, 10, 24, 35].

Лектиновые популяции NK-клеток функционально различны. Они направлены на различные вирусы и клеточные мишени. Имеет место соответствие популяций NK-клеток с соответствующими наборами лектиновых и других рецепторов для вида. Наблюдается паттерновое соответствие взаимодействия лектиновых  $\text{Ly}49\text{H}^+$  NK-клеток мыши против CMV мыши [24]. Популяции NK-клеток человека и макака несущие РЛ отличаются по действию на HIV-1 или SIV [35]. Имеют место скоординированные взаимодействия лектиновых популяций NK-клеток и системы комплемента с вероятным участием ГК-распознающих субизотипов  $\text{C}_{4a}$  и  $\text{C}_{4b}$  [1, 15, 18]. Дифференцировка NK-клеток зависит от возраста [21]. NK-популяции различаются в зависимости от возраста, играют повышенную роль в развитии адаптивного гуморального иммунитета у детей [5, 23]. Отмечены различия фенотипов NK-популяций в связи с полом [29]. Системы РЛ и экспонирующих их NK и других миелоидных клеток различаются, в зависимости от возраста [5, 7, 21, 24, 29, 31]. Популяции NK-клеток определяются наборами лектиновых, Ig-подобных, цитотоксических и других рецепторных маркеров ( $\text{NKG}_2$ , KIR,  $\text{NKP}$ , CD), соотношением их экспрессии, стадий развития, зрелостью.

Развитие NK-клеток от общего лимфоидного предшественника проходит ряд стадий. Появление  $\text{CD}_{122}$  ( $\beta$ -цепи рецептора ИЛ-15) означает начало дифференцировки предшественника в направлении NK-клеток. При дифференцировке NK-клеток происходит прогрессивное экспонирование  $\text{CD}_{161}$ ,  $\text{CD}_{56}$ ,  $\text{CD}_{94}/\text{NKG}_{2A}$ ,  $\text{NKP}_{46}$  ( $\text{NCR}_1$ ,  $\text{CD}_{335}$ ),  $\text{NKP}_{44}$  ( $\text{NCR}_2$ ,  $\text{CD}_{336}$ ),  $\text{NKG}_{2D}$  (экспрессирован на всех NK-клетках человека, участвует во взаимодействии *Cross-Talk* лимфоидных и миелоидных клеток [32]),  $\text{CD}_{16}$  и KIR [21]. Среди перечисленных стадий развития 4 и 5 являются главными для клеток периферической крови и характеризуются появлением  $\text{CD}_{56}^{\text{bright}}$  и  $\text{CD}_{56}^{\text{dim}}$ , соответственно.  $\text{CD}_{56}^{\text{bright}}$  NK-популяция характеризуется высокой степенью экспрессии  $\text{CD}_{94}$ .  $\text{CD}_{56}^{\text{dim}}$  NK-клетки соответствуют KIR- и  $\text{CD}_{16}$ -популяциям, как наиболее зрелым, превращающимся в цитотоксические клетки, которые становятся окончательно зрелыми и экспрессируют  $\text{CD}_{57}$ .

$\text{NKG}_2$ -рецепторы NK-клеток встречаются у субпопуляций Т-лимфоцитов, что предполагает согласованное функционирование NK-клеток и Т-лимфоцитов [10].  $\text{NKG}_{2H}$  экспрессирован у ряда моноцитов периферической крови, в большей степени обнаруживается у Т-клеток, стимулируемых анти- $\text{CD}_3$ -антителами [10].

*Противоопухолевые и противовирусные ответы фенотипов NK-популяций.* На адаптивную экспрессию РЛ и распределение типов РЛ между популяциями иммунокомпетентных клеток оказывают влияние состояние организма (наследственность, возраст, пол, иммунный статус и др.), наличие патологии, типы вирусов и опухолей [7, 8, 31]. Уровни экспрессии  $\text{CD}_{94}^+\text{NKG}_{2C}/\text{NKG}_{2A}^+$ ,  $\text{NKG}_{2D}$ ,  $\text{NKP}_{30}$  ( $\text{NCR}_3$ ,  $\text{CD}_{337}$ ),  $\text{NKP}_{46}$  на NK-клетках с возрастом снижаются [29, 31].

Важными и наиболее изученными популяциями NK-клеток с РЛ  $\text{NKG}_2$ -подсемейства являются  $\text{NKG}_{2A}^+$ ,  $\text{NKG}_{2C}^+$ ,  $\text{NKG}_{2D}^+$ . Их роль и участие в противоопухолевом иммунитете на фоне вирусных инфекций представлена в таблице. Известны и другие сочетания типов РЛ в популяциях NK-клеток [9, 10, 31, 35].

*Антигены CD популяций NK-клеток.* CD функционируют с РЛ на NK-клетках и в составе их популяций. РЛ в сочетании с CD идентифицируются как биомаркеры популяций иммунокомпетентных клеток [3, 4]. CD разнообразят фенотипы популяций NK-клеток, характеризуют первичные или вторичные источники NK-клеток: костный мозг, лимфоидные ткани, кровь. Отметим свойства CD:

- $\text{CD}_3$  и  $\text{CD}_{20}$  - маркеры Т- и В-клеток; отсутствуют у NK-клеток.

- $\text{CD}_{11b}^-\text{CD}_{27}^+$ ;  $\text{CD}_{11b}^-\text{CD}_{27}^+$  - маркеры незрелых NK-клеток [16].

- $\text{CD}_{56}^{\text{bright}}\text{NKG}_{2C}^+$ -популяция, способная к экспансии у лиц с носительством CMV; клетки проявляют ингибиторные Ig-подобные РЛ (KIR и *leukocyte Ig-like receptor* [LILRB1]), специфичные к HLA-класса-I-молекулам (на фоне низких уровней активирующих рецепторов  $\text{NKP}_{46}$  и  $\text{NKP}_{30}$ ) [24];  $\text{CD}_{56}^{\text{bright}}$  - маркер незрелых NK-клеток (более 90% NK-клеток, способны трансформироваться в зрелые) [9].

- $\text{CD}_{56}^{\text{dim}}/\text{CD}_{57}^+\text{NKG}_{2C}^+$ -популяции (зрелые, цитотоксические) выявлены у пациента с CMV и лимфомой [9, 26]; у мужчин выявлено повышение содержания NK-клеток, в том числе NK-клеток  $\text{CD}_{56}^{\text{dim}}$ ,  $\text{CD}_{57}^+$  [29];  $\text{CD}_{57}$  - маркер дифференцированных NK-клеток [28];  $\text{CD}_{56}^{\text{dim}}$ -популяции экспрессируют ингибирующий  $\text{CD}_{94}:\text{NKG}_{2A}$ -рецептор, у лиц, инфицированных CMV экспрессируют активирующий  $\text{CD}_{94}:\text{NKG}_{2C}$ -рецептор и ингибиторный KIR [9].

- $\text{CD}_{69}^+$ ;  $\text{CD}_{69}$  - маркер активации дифференцировки NK-клеток [16].

- $\text{CD}_{94}^+\text{NKG}_2^+$  - реагирующий с HLA-E ингибирующий гетеродимер  $\text{CD}_{94}:\text{NKG}_{2A}$  и активирующий гетеродимер  $\text{CD}_{94}:\text{NKG}_{2C}$  [9, 21, 24], которые альтернативно функционируют с близкородственным HLA-E-рецептором [24].  $\text{CD}_{94}$  играет ключевую роль в защите от вирусов, с вовлечением активирующих рецепторов  $\text{CD}_{94}^+\text{NKG}_2^+$  [24]. ингибирующий  $\text{CD}_{94}:\text{NKG}_{2A}$ -рецептор и активирующий  $\text{CD}_{94}:\text{NKG}_{2C}$ -рецептор используют те же механизмы, что и рецепторы KIR (проявление лектиноподобных свойств у KIR) для угнетения или активации цитотоксичности NK-клеток.

- $\text{CD}_{94}^+\text{NKG}_{2A}^+$ ,  $\text{NKG}_{2D}^+$ ,  $\text{NKP}_{46}^+$  - альтернативно функционирующие популяции NK-клеток [21, 32].

*Цитокины и NK-популяции.* Врожденный противоопухолевый иммунитет реализуется через модуляцию сети цитокинов организма, в результате чего в месте локализации опухоли продуцируются цитотоксические для опухолевых клеток факторы. Индуцируется продукция NK-клетками ИФН $\gamma$  [5, 13, 14, 17, 19 - 21, 26], ФНО [13, 21, 26]. Контроль NK-клеток осуществляется ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-18 [13, 21, 27] с участием колониестимулирующего фактора-1 (CSF $_1$ ) [33]. ИЛ-15 является ключевым для дифференцировки и выживания NK-клеток; потенцирует цитотоксичность  $\text{NKG}_2$ -популяций [5, 21, 27]. На супрессию функций NK-клеток оказывает влияние TGF $\beta$  (*transforming growth factor*) опухолевой природы [7, 36]. Опухолевой CSF $_1$  индуцирует на инфильтрирующих опухоль макрофагах появление RAE-1 $\delta$  - специфического лиганда, регулирующего  $\text{NKG}_{2D}$ -популяции [33].

Способность НК-клеток продуцировать цитокины связана со стадией их развития.  $CD_{56}^{bright}$  НК-популяции определённой стадии зрелости эффективно продуцируют цитокины в ответ на стимулирующие их сигналы.  $CD_{56}^{dim}$  НК-клетки ещё более эффективны в выработке цитокинов при участии активирующих межклеточные пути защиты других НК-популяций с РЛ [21]. ФНО $\alpha$  продуцируется НК-клетками при их дифференцировке, способность продуцировать ИФН $\gamma$  приобретает позднее – на фоне конкуренции с экспрессией  $CD_{56}$  и снижения продукции ИЛ-5 и ИЛ-13 [21].

*Цитотоксические факторы популяций НК-клеток.* При дифференцировке фенотипов в соответствующие усиление цитотоксичности популяции НК-клеток высвобождаются гранзимы А, В, К, перфорин, другие противоопухолевые агенты [5, 16, 20], которые противостоят опухолевым факторам: лактатдегидрогеназам, TGF $\beta$ , CSF $_1$  и др. [7, 33, 36].

*Популяции НК-клеток с противоопухолевой и противовирусной активностью*

Противовирусная активность:

–  $CD_{94}^+NKG_{2c}^+$  - против ретровирусов (HIV-1) [9, 28, 35].  
–  $NKG_{2A}^+KIR^+$  - против герпесвирусов, ограничивают репликацию EBV [25].

–  $CD_{94}^+NKG_{2b}^+$  - против поксвирусов [24].

*Противоопухолевая активность:*

–  $NKG_{2c}^+$ -популяции здоровых людей с повышенной противоопухолевой цитотоксичностью (как в случаях латентного CMV): стимуляция накопления и экспансии в организме [5, 8].

–  $NKG_{2d}$  на моноцитах крови - важные факторы борьбы с карциномами (HCV-индуцированными HCC) [7].

–  $NKG_{2b}^+$ -популяции: накопление сети лектиновых НК-популяций, усиливающих противовирусную защиту организма от EBV, в сочетании с  $\gamma$ Т-клетками [9].

– НК-клетки цитотоксические лимфоцитарные против EBV-ассоциированных опухолей [9].

– Против глиобластомы: лактатдегидрогеназа индуцирует появление  $NKG_{2d}^+$ -моноцитов в крови здоровых и больных людей [7].

*Диагностика противоопухолевого и противовирусного статуса организма*

– Диагностика статуса при заражении детей хроническим гепатитом В (СНВ) по наличию дефектных НК-клеток; при гепатите В – сниженная экспрессия  $NKp_{30}$  на НК-клетках, ведущая к ослаблению популяций дендритных и НК-клеток и снижению продукции ИФН $\gamma$  [17].

– Сочетанные  $KIR^+$  и  $NKG_{2b}^+$ -популяции в диагностике инфекционного мононуклеоза, инициированного CMV или EBV [9].

– Выявление сложных популяций НК-клеток, сочетающих РЛ с CD и другими типами рецепторов.

*Использование НК-клеток против вирусов и опухолей.* Данные стратегии включают динамичное перераспределение популяций НК-клеток (временное или устойчивое усиление одних на фоне ослабления экспрессии других, с учётом направленности на опухолевые мишени и их окружение, кооперации врождённого и адаптивного иммунитета), в зависимости от конкретных обстоятельств, в конечном счёте, направленное на положительный результат. В качестве положительного результата рассматривается предотвращение развития опухолевого процесса, локализация опухоли, приостановка её роста (переход от остро протекающих процессов к латентным), снижение потенциала к метастазированию, повышение и пролонгирование качества жизни (в том числе на фоне инфекций и другой патологии).

Дифференцированные зрелые популяции НК-клеток способны продуцировать цитотоксические противоопухолевые и противовирусные факторы, сбалансированные наборы цитокинов с потенциалом широкого лечебного действия. Ин-

дукторами продукции популяциями НК-клеток защитных факторов могут служить аналоги с подобным вакцине действием цитотоксических опухолевых факторов.

Популяции НК-клеток функционируют совместно с другими клеточными ( $CD_8^+$ -клетки, клетки крови и др.) и более сложными системами врождённого и адаптивного иммунитета. Важную профилактическую и тактическую (подготовленные ответы на опухоль и вирусы) роль во врождённом иммунитете играет накопление в организме, например, в крови противоопухолевых и противовирусных циркулирующих моноцитов с последующей их доставкой к опухоли; накопление и экспансия подготовленных НК-клеток в микроокружение опухоли, экспансия DC и макрофагов в виде инфильтратов опухолевого пространства.

Мультифункциональность вирусных включений в геном человека, в том числе их физиологическая роль для организма, малоизучена, как в случае эндогенных ретровирусов составляющих около 8% повторов в геноме человека [15]. Поскольку такие включения и гены базисной защиты (компоненты комплемента C4B и C4A, реагирующие с ГК) располагаются рядом, есть основания предполагать их единое функционирование [1,15]). Результатом такой защиты может быть появление и длительное присутствие в организме сдерживающих размножение вирусов популяций НК-клеток с защитным набором лектиновых и других рецепторов. Примером могут служить сероположительные здоровые люди с латентной CMV-инфекцией. Более 90% взрослых людей бессимптомно переносят EBV [6]. В организме функционирует адаптивный набор основных терапевтически значимых защитных НК- и других клеточных популяций. Открываются перспективы их использования против вирусов и опухолей.

Отмечается широкий потенциал физиологического и фармакологического действия НК-популяций с экспрессированными РЛ.  $NKG_{2d}$ -рецепторы в паре с лигандами формируют метаболическую надзорную ось взаимосвязи между лимфоидными и миелоидными иммунокомпетентными клетками; стимулируют цитотоксический ответ через  $NKp_{46}$ -рецепторы НК-клеток и цитотоксические рецепторы Т-клеток; индуцируют наборы противоопухолевых и противовирусных цитокинов; поддерживают пролиферацию и выживание эффекторных клеток [32]. Многообразие врождённого иммунитета с участием индуцированных популяций НК-клеток через модуляцию у них наборов РЛ показано в табл. 1. Это может быть использовано при выработке путей и стратегий борьбы с опухолями, ассоциированными с вирусами (в том числе через прямое противовирусное действие). В результате достигается экспансия необходимых НК-клеточных типов и популяций памяти НК-клеточного защитного отдела [9, 12, 13, 24].

Перспективы использования популяций НК-клеток (см. таблицу):

–  $NKG_{2b}^+$ -популяции для создания новых противовирусных стратегий (борьба с HIV-1) [28, 35].

– Направленное использование  $NKG_{2d}^+$ -популяций (моноцитов крови; клеток эпителия кишечника) против опухолей с использованием  $NKG_{2d}$ -рецепторов надзорных эффекторных НК-клеток, постоянно мониторирующих появление на стрессовых клетках опухолевых лигандов – предвестников опухолей [7, 12]. Клетки, экспрессирующие  $NKG_{2d}$ -лиганды, распознаются и элиминируются надзорными клетками, что предотвращает карциногенез, например, развитие рака прямой кишки [12].

– Противоопухолевое использование лигандов для  $NKG_{2c}$  [30].

– Использование популяции  $CD_{56}^{bright}NKG_{2A}^+$  в лечении EBV-ассоциированных В-клеточных лимфом [19].

– Лечение пациентов с острой лимфобластической лейкемией путём восстановления и увеличения численности по-

**Лектиновые популяции НК-клеток в защите от опухолей, сцепленных с вирусными инфекциями**

Вирус	Объекты анализа	Популяции НК-клеток	Роль популяций НК-клеток в противоопухолевой и противовирусной защите
CMV	221.АЕН (трансфицированные HLA-E <sup>+</sup> -клетки лимфомы человека)	NKG <sub>2C</sub> <sup>+</sup> NKG <sub>2A</sub> <sup>-</sup>	НК-цитотоксичность втрое выше, чем у нетрансфицированных клеток HLA-E <sup>+</sup> 721.221; ответ НК (дегрануляция, продукция ИФНγ) локализован в NKG <sub>2C</sub> <sup>+</sup> -популяции; 221.АЕН и ИЛ-15 способствует экспансии популяции в организме, усиливают НК-цитотоксичность против HLA-E <sup>+</sup> опухолевых клеток [5, 30]
CMV	В-клеточные лимфомы мышей	NKG <sub>2C</sub> <sup>+</sup>	После аллогенной трансплантации CMV инициирует действие популяции, независимо от онколизиса, связанного с сигналингом ИЛ-15 [27]
CMV	Периферическая Т-клеточная лимфома пациента	CD <sub>56</sub> <sup>dim</sup> /CD <sub>57</sub> <sup>+</sup> NKG <sub>2C</sub> <sup>+</sup>	После переливания крови и реактивации CMV, популяция через 2 года увеличивается до 33% всех лимфоцитов; продуцирует ФНОα и ИФНγ против клеток лейкемической Т-клеточной лимфомы [26]
CMV	CMV-инфицированные клетки эндотелия аорты доноров почек	NKG <sub>2C</sub> <sup>+</sup>	Характер модуляции популяции зависит от типа CMV-инфицированных клеток; дегрануляция клеток инициируется CMV-инфицированными клетками эндотелия сосудов [8]
CMV	CMV-инфицированные полученные из моноцитов человека дендритные клетки (DC)	KIR <sub>2DL1</sub> <sup>+</sup> KIR <sup>+</sup> NKG <sub>2C</sub> <sup>+</sup> , KIR <sup>+</sup> NKG <sub>2A</sub> <sup>+</sup> , KIR <sup>-</sup> NKG <sub>2C</sub> <sup>-</sup> NKG <sub>2A</sub> <sup>+</sup>	KIR <sub>2DL1</sub> <sup>-</sup> -популяция (но не NKG <sub>2C</sub> <sup>+</sup> ) влияет на инфицированные DC [8] KIR <sup>+</sup> NKG <sub>2C</sub> <sup>+</sup> -популяция не влияет на ответ KIR <sup>-</sup> NKG <sub>2C</sub> <sup>-</sup> NKG <sub>2A</sub> <sup>+</sup> -популяции против EBV [9]
CMV	Лимфомы	CD <sub>57</sub> <sup>+</sup> NKG <sub>2C</sub> <sup>+</sup>	экспансия популяции в ответ на CMV [28]
HCV	Пациенты с гепатоклеточной карциномой (HCC) Ксенографты HCC	NKG <sub>2D</sub> <sup>+</sup> NK <sub>95</sub> (химерные TN-клетки с NKG <sub>2D</sub> <sup>+</sup> )	Повышение экспрессии NKG <sub>2D</sub> на моноцитах крови пациентов является основанием действия популяции против опухолей с лигандами для NKG <sub>2D</sub> [7] Химерная популяция с устойчивой экспрессией NKG <sub>2D</sub> и продукцией ИФНγ сконструирована как резистентная к TGFβ-супрессии и эффективная против TGFβ-продуцирующих опухолевых клеток и роста опухоли <i>in vivo</i> [36]
HPV	аногенитальный рак	NKG <sub>2D</sub> <sup>+</sup>	Усиление NKG <sub>2D</sub> -обусловленной цитотоксичности и сниженной восприимчивости к раку [11]
HPV	рак шейки матки	НК-популяции	Атака опухоли НК-клетками [34]
EBV	Клетки, характерные для инфекционных мононуклеозов; лимфома Беркета I типа	CD <sub>94</sub> <sup>+</sup> NKG <sub>2C</sub> <sup>+</sup>	участвует в альтернативном γδ-Т-клеткам пути защиты организма, в синергичном сочетании с γδ-Т-клетками [9]
EBV	В-клеточная лимфома, «гуманизованная» мышьячная В-клеточная лимфома	CD <sub>56</sub> <sup>bright</sup> NKG <sub>2A</sub> <sup>+</sup>	Высвобождение ИФНγ популяцией и её кооперация с NKp44-рецепторами создают условия для ингибирования В-клеточной трансформации [19]
EBV	CMV-серо(негативные и позитивные) доноры	KIR <sup>+</sup> NKG <sub>2C</sub> <sup>+</sup> NKG <sub>2A</sub> <sup>-</sup>	Выраженная стимуляция в присутствии EBV активации и пролиферации НК-популяции [9]
LCMV	Опухоли мышей	<b>НК-клетки</b>	усиление цитотоксичности НК-клеток (в отличие от VACV) в ответ на присутствие вирусов [16].
VACV		NKG <sub>2A</sub> <sup>+</sup> ; CD <sub>11b</sub> <sup>-</sup> ; CD <sub>27</sub> <sup>+</sup> ; CD <sub>69</sub> <sup>+</sup>	В присутствии вирусов популяции с NKG <sub>2A</sub> экспрессируются сильнее, чем у LCMV-стимулированных НК-клеток (слабое усиление цитотоксичности НК-клеток; сниженные дифференциация НК-клеток и продукция гранзима-В и перфорина); NK <sup>VACV</sup> -клетки – менее дифференцированные, чем NK <sup>LCMV</sup> , со сниженной экспрессией CD <sub>69</sub> [16]

пуляции НК-клеток с экспрессией CD<sub>158a</sub><sup>+</sup> CD<sub>158b</sub><sup>+</sup> перфорина, гранзима К среди популяций НК-клеток, отличающихся экспрессией типов гранзима [20].

– Переливание крови с популяциями НК-клеток направленными на опухоли системы кроветворения [27].

– Направленная с вовлечением НК-популяций регуляция взаимодействий адаптерами (например, DAP<sub>12</sub> и DAP<sub>10</sub> [10; 24; 30]).

– Использование популяций НК-клеток на основе ортологов и паралогов РЛ млекопитающих для терапии пациентов [35].

– Применение противоопухолевых генетически модифицированных химерных НК-клеток - CAR-Т-клеток (например, с экспрессированным химерным рецептором TN, включающим внеклеточный и трансмембранный домены TGFβ-типа-II-рецептора и внутриклеточный домен НК-клеточного активирующего рецептора NKG<sub>2D</sub> [36]).

Перспективны профилактические и терапевтические возможности предотвращения перехода от дисбиотических состояний мукозальных биотопов открытых полостей организма к онкогенезу, в том числе с участием активирующей DDR-путь (*DNA damage response*) системы NKG<sub>2D</sub>/NKG<sub>2D</sub>-лиганды популяций NK-клеток и действия пробиотических лектинов (ПЛ), характеризующихся цитокиноподобной активностью [2, 11, 12]. Поскольку при дисбиозах ПЛ избирательно направлены на условно-патогенные микробы и могут выполнять функции пробиотиков при отсутствии пробиотической микрофлоры в мукозальных биотопах на фоне присутствия в биотопах HPV – потенциальных индукторов рака шейки матки, ожидаем противоположный и противовирусный синергизм ПЛ и NKG<sub>2D</sub>-обусловленной цитотоксичности, снижающей восприимчивость к раку [2, 11].

**Заключение.** Приведённые данные указывают на широкие перспективы лектиновых и других популяций NK-клеток, являющихся основными в межклеточных взаимодействиях для реализации надстроечных множественных вариантов защиты организма в кооперации как с популяциями клеток других типов врождённого иммунитета, так и с сетью адаптивного клеточного иммунитета. Взаимодействие путей основных NK-популяций врождённого иммунитета с надстроечными путями адаптивного иммунитета является неразрывным и сбалансированным в построении противоопухолевых и противовирусных согласованных цитокиновых ответов и соответствует принципу действия «сеть-в-сети». Влияние на сеть NK-популяций лектиновых, Ig-подобных, цитотоксических, CD и других рецепторов, рецепторных лигандов межклеточных взаимодействий перспективно для формирования в организме востребованных ранних продолжительных противоопухолевых и противовирусных процессов различного типа. Целесообразно оценивать имеющийся спектр популяций NK-клеток для отбора потенциальных терапевтических NK-популяций; выработки сочетанных режимов лечения; конструирования максимально эффективных и селективных терапевтических клеточно-цитокиновых комбинаций с участием NK-популяций типа CAR-T. Приведённые данные важны при разработке противоопухолевых, противовирусных, вакцинных препаратов и стратегий. К перспективным лигандам относятся ПЛ.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 5–37 см. REFERENCES)

1. Лактин М.В., Лактин В.М., Афанасьев С.С., Алёшкин В.А. Новые гликоконъюгаты-распознающие системы в прогнозировании антиинфекционного интерактома человека. *Здоровье и образование в XXI веке*. 2015; 17 (4): 378-83.
2. Лактин М.В., Лактин В.М., Афанасьев С.С., Байракова А.Л., Алёшкин В.А., Афанасьев М.С. Кандидные маркёры болезней урогенитальных биотопов: реактивность к лектинам пробиотиков. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018; 3 (1): 49-53.
3. Лактин М.В., Лактин В.М., Афанасьев С.С., Алёшкин В.А., Мironov A.Yu. Лектины и гликоконъюгаты в презентации антигенов и защите от патогенов (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 10: 619-25.
4. Лактин М.В., Лактин В.М., Алёшкин В.А., Афанасьев М.С., Афанасьев С.С. Лектины в антираковых стратегиях. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018; 3 (4): 69-77.

#### REFERENCES

1. Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A. New glycoconjugates-recognizing systems in prognosis of antiinfectious interactome of human. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*. 2015; 17 (4): 378-83. (in Russian)

2. Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Afanasiev S.S., Bayrakova A.L., Aleshkin V.A., Afanasiev M.S. *Candida* markers of urogenital biotopes diseases: reactivity to lectins of probiotics. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018; 3 (1): 49-53. (in Russian)
3. Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A., Mironov A.Yu. Lectins and glycoconjugates in presentation of antigens and protection against pathogens : a review. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63 (10): 619-25. (in Russian)
4. Lakhtin M.V., Lakhtin V.M., Aleshkin V.A., Afanasiev S.S. Lectins in anticancer strategies. *Acta Biomedica Scientifica*. 2018; 3 (4): 69-77. (in Russian)
5. Bigley A.B., Rezvani K., Shah N., Sekine T., Balneger N., Pistillo M. et al. Latent cytomegalovirus infection enhances anti-tumour cytotoxicity through accumulation of NKG2C<sup>+</sup> NK cells in healthy humans. *Clin. Exp. Immunol.* 2016; 185 (2): 239-51.
6. Chijioke O., Landtwing V., Münz C. NK Cell Influence on the Outcome of Primary Epstein-Barr Virus Infection. *Front. Immunol.* 2016; 7: 323
7. Crane C.A., Austgen K., Haberthur K., Hofmann C., Moyes K.W., Avanesyan L., et al. Immune evasion mediated by tumor-derived lactate dehydrogenase induction of NKG2D ligands on myeloid cells in glioblastoma patients. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*. 2014; 111 (35): 12823-8.
8. Djaoud Z., Riou R., Gavlovsky P.J., Mehlah S., Bressollette C., Gérard N. et al. Cytomegalovirus-Infected Primary Endothelial Cells Trigger NKG2C<sup>+</sup> Natural Killer Cells. *J. Innate Immun.* 2016; 8 (4): 374-85.
9. Djaoud Z., Guethlein L. A., Horowitz A., Azzi T., Nemat-Gorgani N., Olive D., Nadal D. et al. Two alternate strategies for innate immunity to Epstein-Barr virus: One using NK cells and the other NK cells and  $\gamma\delta$  T cells. *J. Exp. Med.* 2017; 214 (6): 1827-41.
10. Dukovska D., Fernández-Soto D., Valés-Gómez M., Reyburn H. T. NKG2H-Expressing T Cells Negatively Regulate Immune Responses. *Front. Immunol.* 2018; 9: 390.
11. Espinoza J.L., Nguyen V.H., Ichimura H., Pham T.T., Nguyen C.H., Pham T.V. et al. A functional polymorphism in the NKG<sub>2D</sub> gene modulates NK-cell cytotoxicity and is associated with susceptibility to Human Papilloma Virus-related cancers. *Sci. Rep.* 2016; 6: 39231.
12. Espinoza J.L., Minami M. Sensing Bacterial-Induced DNA Damaging Effects via Natural Killer Group 2 Member D Immune Receptor: From Dysbiosis to Autoimmunity and Carcinogenesis. *Front. Immunol.* 2018; 9: 52.
13. Fehniger T.A., Cooper M.A. Harnessing NK cell memory for cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* 2016; 37(12):877-88.
14. Georgountzou A., Papadopoulos N.G. Postnatal Innate Immune Development: From Birth to Adulthood. *Front. Immunol.* 2017; 8: 957.
15. Grandi N., Cadeddu M., Pisano M.P., Esposito F., Blomberg J., Tramontano E. Identification of a novel HERV-K(HML10): Comprehensive characterization and comparative analysis in non-human primates provide insights about HML10 proviruses structure and diffusion. *Mob. DNA*. 2017; 8: 15.
16. Hatfield S.D., Daniels K.A., O'Donnell C.L., Waggoner S.N., Welsh R.M. Weak vaccinia virus-induced NK cell regulation of CD<sub>4</sub> T cells is associated with reduced NK cell differentiation and cytolytic activity. *Virology*. 519: 131-44.
17. Heiberg I.L., Pallett L.J., Winther T.N., Høgh B., Maini M.K., Peppas D. Defective natural killer cell anti-viral capacity in paediatric HBV infection. *Clin. Exp. Immunol.* 2015; 179 (3): 466-76.
18. Janelle V., Langlois M.P., Tarrab E., Lapiere P., Poliquin L., Lamarre A. Transient complement inhibition promotes a tumor-specific immune response through the implication of natural killer cells. *Cancer Immunol. Res.* 2014; 2 (3): 200-6.
20. Koltan S., Debski R., Koltan A., Grzesek E., Tejza B., Eljaszewicz A. et al. Phenotype of NK cells determined on the basis of selected immunological parameters in children treated due to acute lymphoblastic leukemia. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94 (52): e2369.
21. Mahapatra S., Mace E.M., Minard C.G., Forbes L.R., Vargas-Hernandez A., Duryea T.K. et al. High-resolution phenotyping identifies NK cell subsets that distinguish healthy children from adults. 2017; 12 (8): e0181134.
22. Malone D.F.G., Lunemann S., Hengst J., Ljunggren H.G., Manns

- M.P., Sandberg J.K. et al. Cytomegalovirus-Driven Adaptive-Like Natural Killer Cell Expansions Are Unaffected by Concurrent Chronic Hepatitis Virus Infections. *Front. Immunol.* 2017; 8: 525.
23. Martinez D. R., Permar S. R., Fouda G. G. Contrasting Adult and Infant Immune Responses to HIV Infection and Vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 23 (2): 84-94.
24. Muntasell A., Vilches C. Angulo A. López-Botet M. Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: a different perspective of the host-pathogen interaction. *Eur. J. Immunol.* 2013; 43 (5): 1133-41.
25. Münz C. Epstein-Barr Virus-Specific Immune Control by Innate Lymphocytes. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1658.
26. Muta T., Yoshihiro T., Jinnouchi F., Aoki K., Kochi Y., Shima T. et al. Expansion of NKG<sub>2C</sub>-expressing natural killer cells after umbilical cord blood transplantation in a patient with peripheral T-cell lymphoma with cytotoxic molecules. *Intern. Med.* 2018; 57 (6): 861-6.
27. Peled J. U., Jenq R. R. Not just leukemia: CMV may protect against lymphoma recurrence after allogeneic transplant. *Leuk. Lymphoma.* 2017; 58 (4): 759-61.
28. Peppas D. Natural killer cells in human immunodeficiency virus-1 infection: spotlight on the impact of human cytomegalovirus. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1322.
29. Phan M.T., Chun S., Kim S.H., Ali A.K., Lee S.H., Kim S. et al. Natural killer cell subsets and receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of a healthy Korean population: Reference range, influence of age and sex, and correlation between NK cell receptors and cytotoxicity. *Hum. Immunol.* 2017; 78 (2): 103-12.
30. Pupuleku A., Costa-García M., Farré D., Hengel H., Angulo A., Muntasell A. et al. Elusive Role of the CD<sub>94</sub>/NKG<sub>2C</sub> NK cell receptor in the response to cytomegalovirus: novel experimental observations in a reporter cell system. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1317.
31. Sundström Y., Nilsson C., Lilja G., Kärre K., Troye-Blomberg M., Berg L. The expression of human natural killer cell receptors in early life. *Scand. J. Immunol.* 2007; 66 (2-3): 335-44.
32. Stojanovic A., Correia M.P., Cerwenka A. The NKG<sub>2D</sub>/NKG<sub>2DL</sub> Axis in the crosstalk between lymphoid and myeloid cells in health and disease. *Front. Immunol.* 2018; 9: 827.
33. Thompson T.W., Jackson B.T., Li P.J., Wang J., Kim A.B., Huang K.T.H. et al. Tumor-derived CSF-1 induces the NKG<sub>2D</sub> ligand RAE-1 $\delta$  on tumor-infiltrating macrophages. *Elife.* 2018; 7. pii: e32919.
34. Uppendahl L.D., Dahl C.M., Miller J.S., Felices M., Geller M.A. Natural killer cell-based immunotherapy in gynecologic malignancy: a review. *Front. Immunol.* 2018; 8: 1825.
35. Walter L., Petersen B. Diversification of both KIR and NKG<sub>2</sub> natural killer cell receptor genes in macaques - implications for highly complex MHC-dependent regulation of natural killer cells. *Immunology.* 2017; 150 (2): 139-45.
36. Wang Z., Guo L., Song Y., Zhang Y., Lin D., Hu B. et al. Augmented anti-tumor activity of NK-92 cells expressing chimeric receptors of TGF- $\beta$ R II and NKG<sub>2D</sub>. 2017; 66 (4): 537-48.
37. Zingoni A., Molfetta R., Fionda C., Soriani A., Paolini R., Cippitelli M. et al. NKG2D and Its Ligands: «One for All, All for One». *Front. Immunol.* 2018; 9: 476.

Поступила 21.01.19

Принята к печати 20.02.19

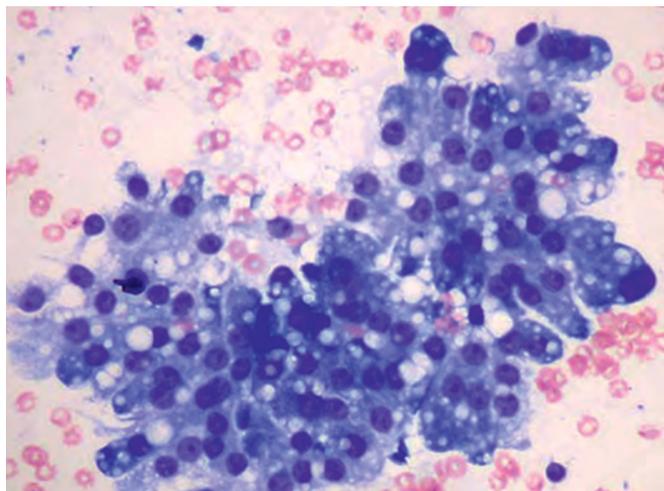


Рис. 1. Лактирующая аденома молочной железы. Цитологический препарат. Окр. азур-эозином. Ув.х 400.

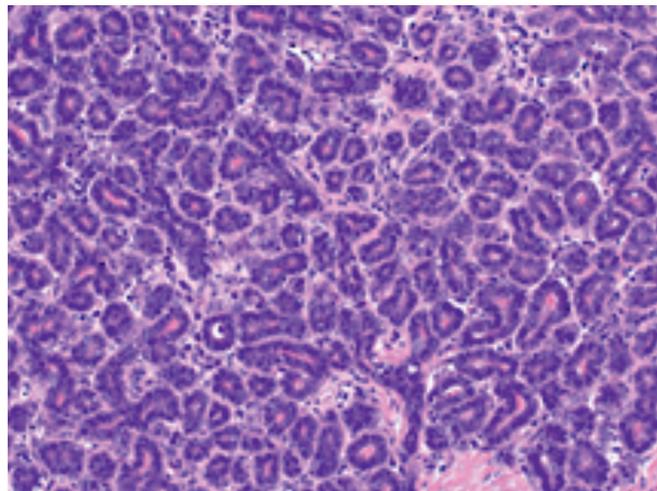


Рис.3. Лактирующая аденома молочной железы. Гистологический препарат. Окр. гематоксилин-эозином. Ув.х 200.

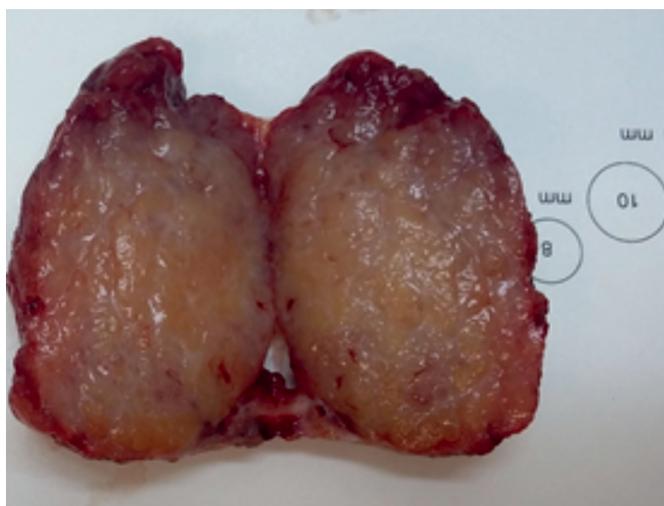


Рис. 2. Опухоль на разрезе. Макроскопическая картина.

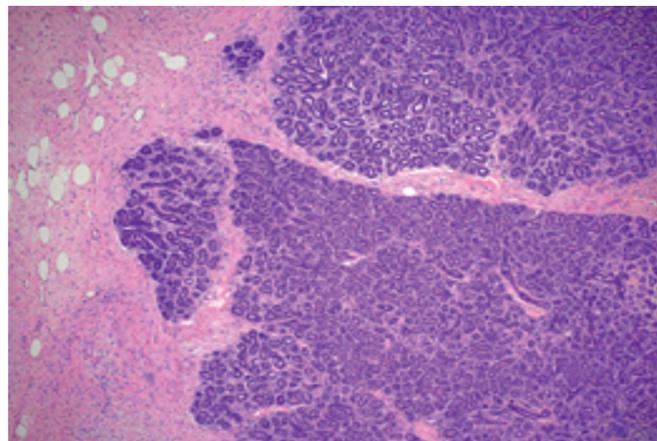


Рис.4. Лактирующая аденома молочной железы. Гистологический препарат. Окр. гематоксилин-эозином. Ув.х 100.

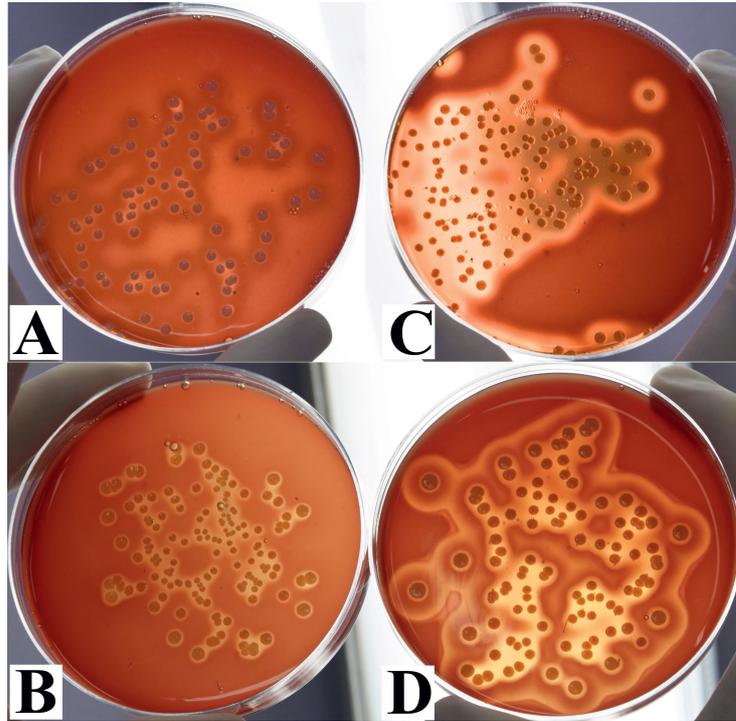


Рис. 1. Результаты теста штаммов *S. aureus* на гемолитическую активность на среде МПА с добавлением 5% бараньей крови при 48 часовой инкубации при 37° С и дополнительной инкубации в течение 24 ч при 10° С: А - *S. aureus* MRSA252; В - *S. aureus* В-7904; С - *S. aureus* В-7803; D - *S. aureus* В-7905.

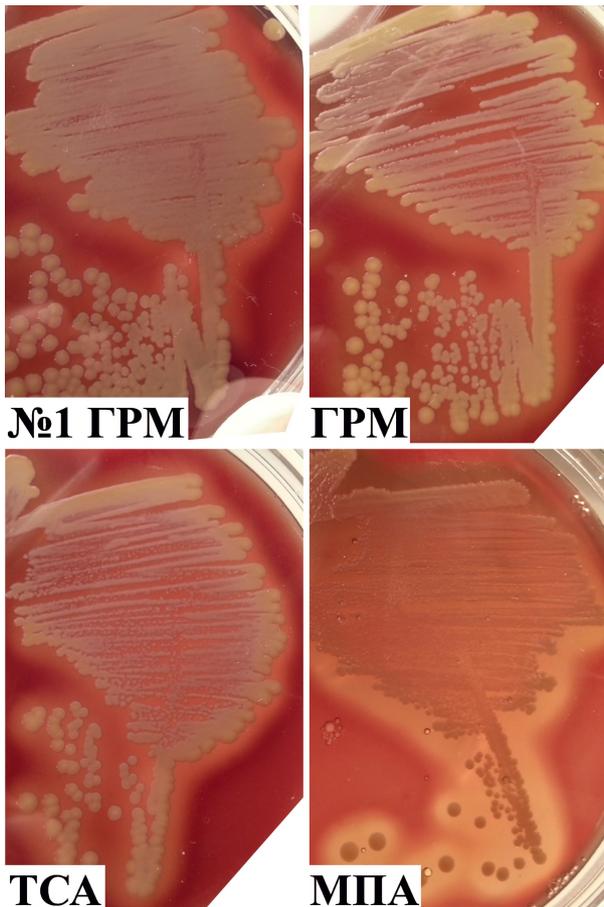


Рис. 2. Тест на гемолитическую активность штамма *S. aureus* В-7803, вариант гемолиза С, на четырех типах среды с добавлением 5% бараньей крови: среда №1, ТСА, ГРМ-агар, МПА.



Рис. 3. Тест на гемолитическую активность контрольного штамма *S. aureus* ATCC 10832 (Wood 46) на МПА с добавлением 5% бараньей крови. Зона гемолиза соответствует варианту С.