

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 65

5 • 2020

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

Зав. редакцией Л.А. Шанкина

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

Художественный редактор

Е.М. Архипова

Сдано в набор 20.03.2020.

Подписано в печать 5.04.2020.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.akc.ru,

www.pressa-ef.ru

Подписка на электронную версию:

eLibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клиническая лабораторная диагностика.
2020. № 5. 265–336.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор А.Ю. МИРОНОВ

А.Б. ДОБРОВОЛЬСКИЙ, В.В. ДОЛГОВ, Г.Н. ЗУБРИХИНА, А.А. ИВАНОВ, С.А. ЛУГОВСКАЯ, С.Г. МАРДАНЛЫ, В.Т. МОРОЗОВА, Л.М. СКУИНЫ, А.А. ТОТОЛЯН, Г.Г. ХАРСЕЕВА (ответственный секретарь), И.П. ШАБАЛОВА

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

OAO IZDATEL'STVO
"MEDITSINA"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 65
5 • 2020

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

Managing editor L.A. Shankina

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

The Journal is presented in data base of the Russian index of scientific quotation (RiNZ) and in following I&R editions: Abstracts of Micology, Adis International Ltd Reactions Weekly, Chemical Abstracts (print), Chemical Titles, EBCOhost Biological Abstracts (Online), Elsevier BV 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 A.Yu MIRONOV

A.B. DOBROVOLSKYI, V.V. DOLGOV, G.N. ZUBRIKHINA, A.A. IVANOV, S.A. LUGOVSKAYA, S.G. MARDANLY, V.T. MOROZOVA, L.M. SKUIN', A.A. TOTOLYAN, G.G. KHARSEEVA (executive editor), I.P. SHABALOVA

EDITORIAL COUNCIL:

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*), I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV (*Ufa*), D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK (*Kishinev*), N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*), T.I. DOLGIKH (*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*), A.V. INDUTNY (*Omsk*), V.A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*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. MAVZYTTOV (*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*)



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

СОДЕРЖАНИЕ

БИОХИМИЯ

- Реук С.Э., Терехина Н.А.*
Разработка способа оценки эффективности лечения детей больных герпетическим стоматитом 269

ГЕМАТОЛОГИЯ

- Захарова Н.О., Булгакова С.В., Тренева Е.В., Гусева В.М.*
Особенности анемического синдрома у гериатрических пациентов с хронической болезнью почек 275

КОАГУЛОЛОГИЯ

- Садов Р.И., Панова И.А., Назаров С.Б., Кузьменко Г.Н., Клычева М.М.*
Изменения показателей тромбоэластографии и функции тромбоцитов у беременных женщин с различными формами гипертензивных расстройств в III триместре беременности 281

ИММУНОЛОГИЯ

- Королёва-Ушакова А.Г., Баранова Е.В., Игнатов С.Г., Федюкина Г.Н., Соловьев П. В., Коломбет Л.В., Бикетов С.Ф.*
Использование синтетических гликоконъюгатов в качестве компонентов иммунохроматографических тестов для ускоренной серодиагностики лепры 289

- Борзова Н.Ю., Иваненкова Н.И., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И.*
Новые ранние прогностические критерии исхода беременности у пациенток с привычным выкидышем 294

- Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Крошкина Н.В., Таланова И.Е., Куст А.В., Козелкова Е.В.*
Особенности содержания цитокинов периферической крови у беременных женщин с привычным невынашиванием беременности 299

- Маркелова Е.А., Лутай Ю.А.*
Совершенствование лабораторной диагностики метаболического синдрома с артериальной гипертензией у больных пожилого возраста 304

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Егорова С. А., Кафтырева Л. А., Помазанов В.В.*
Современные тенденции развития устойчивости бактерий рода *Salmonella* к клинически значимым антибиотикам (обзор литературы) 308

- Калимулина К.Р., Исмагуллин Д.Д., Лямин А.В., Кондратенко О.В., Козлов А.В., Жестков А.В.*
Представители *Mycobacterium abscessus* complex у пациентов с бронхолегочной патологией: распространенность, особенности культивирования и идентификации 316

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Кушлинский Н.Е., Уткин Д.О., Логинов В.И., Филиппова Е.А., Бурдённый А.М., Кушлинский Д.Н., Пронина И.В., Брага Э.А.*
Клиническая значимость метилирования группы генов микроРНК у больных раком яичников 321

- Оборин Д.А., Николаева Н.В., Годовалов А.П., Карпунина Т.И.*
Этиология гнойно-воспалительных процессов в генитальном тракте: подозрения клиницистов и проблемы лабораторного подтверждения 328

- Добровольская Н.Ю., Прищета Н.П., Преображенская Е.В., Пчелова Н.Н.*
ПЦР-исследование как вспомогательный метод диагностики перипротезной инфекции после эндопротезирования суставов (клинический случай) 336

CONTENTS

BIOCHEMISTRY

- Reuk S.E., Terekhina N.A.*
Development of a method for evaluating the effectiveness of treatment of children with herpetic stomatitis. 269

HEMATOLOGY

- Zakharova N.O., Bulgakova S.V., Treneva E.V., Guseva V.M.*
Specificity of anemic syndrome in geriatric patients with chronic kidney disease. 275

COAGULOLOGY

- Sadov R.I., Panova I.A., Nazarov S.B., Kuzmenko G. N., Klycheva M.M.*
Changes in the indicators of thromboelastography and platelet function in pregnant women with various forms of hypertensive disorders in the third trimester of pregnancy. 281

IMMUNOLOGY

- Korolyova-Ushakova A.G., Baranova E.V., Ignatov S.G., Fedyukina G.N., Solov'ev P.V., Kolombet L.V., Biketov S.F.*
The use of synthetic glycoconjugates as components of the immunochromatographic test for rapid serological diagnosis of leprosy 289

- Borzova N.Yu., Ivanenkova N.I., Sotnikova N.Yu., Malyshkina A.I.*
New early prognostic criteria for pregnancy outcome in women with recurrent miscarriage 294

- Malyshkina A.I., Sotnikova N.Y., Kroshkina N.V., Talanova I.E., Kust A.V., Kozelkova E.V.*
Peculiarities of the content of peripheral blood cytokines in pregnant women with a habitual miscarriage 299

- Markelova E.A., Lutay Yu.A.*
Improvement of laboratory diagnostics of metabolic syndrome with arterial hypertension in elderly patients 304

MICROBIOLOGY

- Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Pomazanov V.V.*
Current trends in the development of resistance to clinically significant antibiotics in *salmonella* (review of literature) 308

- Kalimulina K.R., Ismatullin D.D., Lyamin A.V., Kondratenko O.V., Kozlov A.V., Zhestkov A.V.*
Mycobacterium abscessus complex representatives in patients with bronchopulmonary pathology: prevalence, peculiarities of cultivation and identification 316

CLINICAL MOLECULAR STUDIES

- Kushlinskii N.E., Utkin D.O., Loginov V.I., Filippova E.A., Burdennyi A.M., Kushlinsky D.N., Pronina I.V., Braga E.A.*
Clinical significance of methylation of a group of miRNA genes in ovarian cancer patients 321

- Oborin D.A., Nikolaeva N.V., Godovalov A.P., Karpunina T.I.*
Etiology of purulent inflammatory processes in the genital tract: suspicions of clinicians and problems of laboratory confirmation . . . 328

- Dobrovolskaya N.Yu., Prishchepa N.P., Preobrazhenskaya E.V., Pchelova N.N.*
PCR research as an auxiliary method for diagnostics of periphresitital infection after endostredition of joints (clinical case). 336

БИОХИМИЯ

© РЕУК С.Э., ТЕРЕХИНА Н.А., 2020

Реук С.Э., Терехина Н.А.

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ДЕТЕЙ БОЛЬНЫХ ГЕРПЕТИЧЕСКИМ СТОМАТИТОМ

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614000, Пермь, Россия

Высокая частота герпетической инфекции у детей определяет необходимость поиска новых маркеров диагностики, оценки эффективности лечения и прогнозирования рецидивов заболевания. Цель работы – оценить возможность использования биохимического анализа ротовой жидкости для оценки эффективности лечения детей больных острым герпетическим стоматитом. В ротовой жидкости и плазме крови 28 детей больных острым герпетическим стоматитом в динамике заболевания спектрофотометрически определяли содержание общего белка, белков острой фазы воспаления, кальция, магния, меди, цинка. В качестве контроля использовали ротовую жидкость и плазму крови 45 практически здоровых детей. При остром герпетическом стоматите в ротовой жидкости детей увеличивается содержание С-реактивного белка, оросомукоида, α1-антитрипсина, церулоплазмينا, преальбумина и микроальбумина, а также магния, кальция и цинка, но снижается уровень общего белка и трансферрина. В плазме крови при этом заболевании уровень церулоплазмينا, оросомукоида, С-реактивного белка, α1-антитрипсина выше, а содержание цинка ниже, чем у здоровых детей. Содержание меди в ротовой жидкости и плазме крови детей увеличивается при герпетическом стоматите средней степени тяжести, а при тяжелом герпетическом стоматите достоверно снижается. Степень изменений содержания белков острой фазы воспаления и показателей минерального обмена ротовой жидкости и плазмы крови детей при герпетической инфекции полости рта коррелирует с тяжестью заболевания. Были выявлены высокозначимые корреляционные связи при сравнении концентраций белков острой фазы воспаления, электролитов между ротовой жидкостью и плазмой крови детей при остром герпетическом стоматите. После лечения детей больных острым герпетическим стоматитом содержание минеральных веществ и белков острой фазы воспаления в ротовой жидкости нормализуется лишь при легкой степени тяжести заболевания. Разработан способ оценки эффективности лечения детей больных острым герпетическим стоматитом по определению содержания минеральных веществ в ротовой жидкости. Коэффициент соотношения содержания меди к кальцию в ротовой жидкости детей больше 45 следует считать показателем эффективного лечения детей при герпетическом стоматите.

Ключевые слова: белки; минеральные вещества; ротовая жидкость; герпетический стоматит.

Для цитирования: Реук С.Э., Терехина Н.А. Разработка способа оценки эффективности лечения детей больных герпетическим стоматитом. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65(5): 269-274. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-269-274>

Reuk S.E., Terekhina N.A.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR EVALUATING THE EFFECTIVENESS OF TREATMENT OF CHILDREN WITH HERPETIC STOMATITIS

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "E.A. Vagner Perm State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 614990, Perm, Russian Federation

The high frequency of herpes infection in children determines the need to search for new diagnostic markers, evaluate treatment efficacy and predict relapse of the disease. The purpose of the work is to assess the possibility of using biochemical analysis of oral fluid to assess the effectiveness of treatment of children with acute herpetic stomatitis. In the oral fluid and blood plasma of 28 children of patients with acute herpetic stomatitis in the dynamics of the disease, the content of total protein, proteins of the acute phase of inflammation, as well as the concentrations of calcium, magnesium, copper and zinc was determined spectrophotometrically. Oral fluid and blood plasma of 45 practically healthy children were used as a control. In acute herpetic stomatitis, the content of C-reactive protein, orosomuroid, α1-antitrypsin, ceruloplasmin, prealbumin and microalbumin, as well as magnesium, calcium and zinc, increases in the oral fluid of children, but the level of total protein and transferrin decreases. In this blood plasma, the level of ceruloplasmin, orosomuroid, C-reactive protein, α1-antitrypsin is higher, and zinc is lower than in healthy children. The copper content in the oral fluid and blood plasma of children increases with moderate herpetic stomatitis, and significantly decreases with severe herpetic stomatitis. The degree of changes in the content of the proteins of acute phase of inflammation and indicators of mineral metabolism of the oral fluid and blood plasma of children with a herpetic infection of the oral cavity correlates with the severity of the disease. Highly significant correlations were revealed when comparing the concentrations of proteins of the acute phase of inflammation, electrolytes between the oral fluid and the blood plasma of children with acute herpetic stomatitis. After treatment of children with acute herpetic stomatitis, the content of minerals and proteins of the acute phase of inflammation in the oral fluid returned to normal only with a mild disease severity. A method has been developed for evaluating the effectiveness of treatment of children with acute herpetic stomatitis by determining the content of minerals in the

oral fluid. The ratio of copper to calcium in the oral fluid of children more than 45 should be considered an indicator of effective treatment of children with herpetic stomatitis.

Key words: *proteins; minerals; saliva; herpetic stomatitis.*

For citation: *Reuk S.E., Terekhina N.A. Development of a method for evaluating the effectiveness of treatment of children with herpetic stomatitis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (5): 269-274. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-269-274>*

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

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

Received 11.02.2020
Accepted 06.03.2020

Введение. В конце XX века Всемирная организация здравоохранения объявила о пандемии герпетической инфекции в мире. Почти 70-90% детей инфицированы вирусом простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типа [1, 2]. Острый герпетический стоматит у детей является клиническим проявлением первичного инфицирования вирусом [3-5]. За последние годы наблюдается учащение рецидивов и утяжеление герпетического стоматита [1,4]. У 70% детей, перенесших герпетический стоматит, инфекция в дальнейшем протекает с обострениями в форме хронического рецидивирующего герпетического стоматита [1, 3, 4], а также лабиального герпеса или офтальмогерпеса [3, 4, 6]. Высокая частота герпетической инфекции диктует необходимость поиска новых маркеров диагностики, прогнозирования рецидивов и оценки эффективности лечения заболеваний.

Латентное инфицирование ВПГ с периодической активацией изменяет метаболические процессы в инфицированных тканях организма, что приводит к размножению вируса и дальнейшим рецидивам заболевания [6,7]. В ходе эволюции у ВПГ выработалась стратегия, направленная на перестройку систем инфицированной им клетки. ВПГ в зараженной клетке способен угнетать синтез энзимов и белков, которые препятствуют его воспроизводству [7].

При герпетическом кератите усиливаются процессы свободнорадикального окисления, снижается антиоксидантная защита [8-11], нарушается обмен белков, активность ферментов [8,12-14], изменяется минеральный состав в слезной жидкости и тканях глаза [13-15]. Разработаны способы прогнозирования рецидива герпетического кератита у взрослых людей по определению в слезе активности дегидрогеназ [16], а у детей – гликозидаз [17].

При острой герпетической инфекции лимфоциты периферической крови содержат и транспортируют ВПГ [18]. При офтальмогерпесе в эритроцитах и лимфоцитах периферической крови интенсифицируются процессы свободнорадикального окисления и изменяется антиоксидантная защита. [18,19].

Состав ротовой жидкости (РЖ) тесно связан с метаболическими процессами, происходящими в тканях слизистой полости рта, и зависит от скорости ее секреции и способа получения [20-24]. Установлены возрастные особенности содержания минеральных веществ в РЖ здоровых детей [25]. Содержание минеральных веществ в РЖ увеличивается в 1,5-2 раза у

шестилетних детей и в 2-6 раз у подростков по сравнению с детьми трехлетнего возраста [25]. Исследование РЖ возможно для неинвазивного скрининга больших групп населения, тогда как использование образцов крови, особенно в педиатрической практике, может быть затруднительным [5,23,25,26]. РЖ является альтернативной плазме крови биологической жидкостью для оценки интенсивности воспаления при герпетическом стоматите у детей [2,5].

Цель исследования: оценить возможность использования биохимического анализа ротовой жидкости для оценки эффективности лечения детей больных острым герпетическим стоматитом.

Материал и методы. В ротовой жидкости и плазме крови 28 детей больных острым герпетическим стоматитом спектрофотометрически в динамике заболевания определяли содержание общего белка по [27], белков острой фазы воспаления: С-реактивного белка (СРБ), α_1 -антитрипсина, орозомукоида, преальбумина, трансферрина по [28], микроальбумина и альбумина по [29,30], церулоплазмину по [31], а также содержание кальция по [32], магния по [33], меди по [34], цинка по [35]. Образцы нестимулированной РЖ собирали до и после лечения герпетического стоматита натошак путем сплевывания. В качестве критериев включения считали наличие единичных или множественных типичных афтозных герпетических высыпаний на слизистой оболочке полости рта, зева и/или кайме губ у детей, отсутствие признаков гнойной инфекции. Критериями исключения являлись наличие сопутствующих стоматологических заболеваний. В контрольной группе использовали РЖ и плазму крови 45 практически здоровых детей.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программ табличного процессора Microsoft Office Excel® 2016, статистической программы MedCalc® 15.8 Portable. При выборе методов статистической обработки изучался характер нормальности распределения признаков с учетом значений показателей асимметрии, эксцесса и коэффициента вариации, а также поправки Ван дер Вардена. Для анализа количественных признаков при нормальном распределении исходных данных применялись средняя арифметическая (M) и ошибка репрезентативности (m). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для выявления силы корреляционной связи между двумя параметрами использовали коэффициент корреляции Пирсона – (r).

При этом величина $|r| \geq 0,7$ свидетельствовала о сильной связи, средняя связь характеризовалась $|r| = 0,69 - 0,3$, при $|r| < 0,3$ связь расценивалась как слабая.

Результаты. Содержание всех изученных белков в РЖ здоровых детей ниже, чем в плазме крови: СРБ и преальбумина почти в 3-4 раза, а общего белка, орозоумукоида, α_1 -антитрипсина, церулоплазмينا, трансферрина – более чем на порядок (табл. 1). С возрастом в РЖ здоровых детей уровень СРБ, церулоплазмينا увеличивается, а содержание микроальбумина, преальбумина, α_1 -антитрипсина снижается.

При остром герпетическом стоматите в РЖ детей уровень общего белка статистически значимо снижается почти в 2 раза по сравнению со здоровыми детьми, тогда как в плазме крови подобных изменений не наблюдается (табл. 1). В РЖ и плазме крови детей при этом заболевании по сравнению со здоровыми детьми увеличивается содержание СРБ, орозоумукоида, церулоплазмينا – в 3-4 раза, α_1 -антитрипсина – в 2 раза (см. табл. 1). Повышение уровня этих белков в плазме крови и РЖ зависит от интенсивности воспаления тканей пародонта. Наибольшее увеличение содержания белков острой фазы воспаления в РЖ детей наблюдается при тяжелом герпетическом стоматите. Содержание преальбумина и микроальбумина при герпетическом инфицировании тканей полости рта увеличивается почти в 2-3 раза только в РЖ, тогда как в плазме крови изменений концентрации этих белков не наблюдается. Вместе с тем, наряду с увеличением концентрации большинства изученных белков в РЖ детей, содержание трансферрина статистически значимо снижается в 2-3 раза при средней степени тяжести и тяжелом герпетическом стоматите.

Были выявлены высокозначимые корреляционные связи при сравнении концентраций орозоумукоида и микроальбумина/альбумина между РЖ и плазмой крови детей в период разгара острого герпетического стоматита (табл. 2). Прямая корреляционная зависимость средней силы выявлена в сравнении содержания СРБ, α_1 -антитрипсина, церулоплазмينا, трансферрина, преальбумина в РЖ и плазме крови при этом заболевании.

Многие гемопротеины, выполняя транспортную роль, участвуют в переносе из плазмы крови через

гистагематические барьеры ионов металлов. Так, церулоплазмин является белком - переносчиком ионов меди, альбумин участвует в транспорте магния, кальция, цинка, а трансферрин переносит трехвалентное железо. Уровень меди в РЖ здоровых детей идентичен содержанию этого элемента в плазме крови, а цинка в РЖ в 3-4 раза меньше, чем в крови. Уровень кальция и магния в плазме крови здоровых детей почти на порядок выше, чем в РЖ. При остром герпетическом стоматите в РЖ детей содержание магния увеличивается в 5-6 раз, содержание цинка повышается почти в 2 раза, а кальция – в 4 раза по сравнению со здоровыми детьми (табл. 3). Наибольшее увеличение содержания этих минеральных веществ в РЖ наблюдается при тяжелом и средней степени тяжести герпетическом стоматите. Содержание меди в РЖ и плазме крови детей при остром герпетическом стоматите средней степени тяжести увеличивается почти в 2 раза, а при тяжелом герпетическом стоматите достоверно снижается по сравнению с контролем. В плазме крови детей при герпетическом воспалении слизистой полости рта содержание кальция и магния не изменяется, а концентрация цинка снижается в 1,5 раза по сравнению со здоровыми детьми. Коэффициент корреляции Пирсона при оценке зависимости содержания изученных электролитов между РЖ и плазмой крови у детей при остром герпетическом стоматите показал прямую связь средней силы (см. табл. 2).

После лечения детей больных острым герпетическим стоматитом содержание минеральных веществ и белков острой фазы воспаления в РЖ нормализовалось лишь при легкой степени тяжести заболевания, а после тяжелого и средней степени тяжести герпетического стоматита изученные показатели оставались измененными у 40-70% пациентов.

Разработан способ оценки эффективности лечения детей больных острым герпетическим стоматитом по биохимическому анализу ротовой жидкости [36]. Для оценки эффективности лечения детей больных острым герпетическим стоматитом предложен коэффициент соотношения содержания меди к кальцию (Cu/Ca) в РЖ. Значение этого показателя в РЖ здоровых детей составляет 94–104. В период разгара легкого острого герпетического стоматита коэффици-

Таблица 1

Содержание белков в ротовой жидкости и плазме крови детей при остром герпетическом стоматите

Показатель	Ротовая жидкость			Плазма крови		
	контроль	до лечения	после лечения	контроль	до лечения	после лечения
Общий белок, г/л	4,42±0,27	2,78±0,25*	2,33±0,16*	74,82±2,48	68,42±1,95	70,67±2,19
СРБ, мг/л	1,10±0,11	3,22 ± 0,53*	2,07±0,25*	2,84±0,28	9,54±1,85*	4,65±0,81*
Орозоумукоид, мг/дл	2,81±0,44	11,18±0,92*	7,63±1,32*	71,0±6,46	173,11±13,78*	129,0±15,5*
α_1 -антитрипсин, мг/дл	4,43±0,50	9,53±1,33*	6,38±0,78*	150,44±12,4	203,67±13,21*	173,0±7,47
Церулоплазмин, мг/л	20,27±5,21	80,80±10,6*	53,19±6,75*	290,48±14,52	672,63±56,30*	488,7±43,6*
Трансферрин, мг/дл	16,1±1,56	8,94±1,15*	10,38±1,07*	203,78±9,58	243,11±19,15	222,89±10,0
Преальбумин, мг/дл	5,71±0,55	10,84±1,18*	8,13±0,93	20,94 ± 2,69	23,72 ± 2,60	21,33±1,55
Микро-альбумин, мг/л	13,69±1,1	43,12±6,16*	38,67±4,16*	–	–	–
Альбумин, г/л	–	–	–	41,92±1,69	40,33±2,18	41,47±2,08

Примечание: * – $p < 0,05$.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции содержания белков и минеральных веществ в ротовой жидкости и плазме крови детей при остром герпетическом стоматите

Показатель	До лечения	После лечения
Общий белок	r = 0,29	r = 0,27
СРБ	r = 0,52	r = 0,31
Орозомукоид	r = 0,83	r = 0,57
α 1-антитрипсин	r = 0,42	r = 0,6
Церулоплазмин	r = 0,34	r = 0,17
Трансферрин	r = 0,58	r = 0,36
Преальбумин	r = 0,4	r = 0,29
Микроальбумин/альбумин	r = 0,82	r = 0,16
Кальций	r = 0,43	r = 0,44
Магний	r = 0,6	r = 0,34
Цинк	r = 0,45	r = 0,53
Медь	r = 0,52	r = 0,54

ент Cu/Ca составляет больше 40, при средней степени тяжести – 10-30, а при тяжелом герпетическом стоматите – меньше 10. Содержание меди в РЖ нормализуется, а уровень кальция остается повышенным после лечения тяжелого и средней степени тяжести острого герпетического стоматита. О неэффективности терапии острого герпетического стоматита свидетельствует коэффициент Cu/Ca в РЖ равный или ниже 45.

Обсуждение. Установлены возрастные особенности содержания в РЖ здоровых детей не только минеральных веществ [25], но и показателей белкового спектра. Белки в РЖ попадают из слюнных желез или фильтруются из плазмы крови путем активного транспорта с помощью лиганд-связывающих рецепторов [20]. Увеличение в РЖ здоровых детей уровня высокомолекулярных белков и снижение содержания белков с низкой молекулярной массой (микроальбумина, преальбумина, α 1-антитрипсина) связано с морфофункциональными особенностями гистогематических барьеров тканей пародонта, тонким эпителиальным покровом, низкой дифференцировкой структур соединительной ткани слизистой оболочки полости рта и селективной пропускной способностью гематосаливарного барьера у детей младшего возраста для белков острой фазы воспаления [1,26].

Возрастная динамика увеличения содержания изученных минеральных веществ в РЖ детей коррелирует со сроками прорезывания молочных и постоянных зубов, периодами активного роста и формирования костного скелета и твердых тканей полости рта, отражая морфофункциональные изменения структур тканей зуба.

При экспериментальном герпетическом инфицировании тканей полости рта крыс увеличивается содержание белков острой фазы воспаления в тканях независимо от места поражения: не только в герпесинфицированной, но и во внешне здоровой противоположной стороне слизистой оболочки полости рта [37]. В период разгара герпетического стоматита усиливается саливация, что объясняет снижение содержания общего белка в РЖ без изменений его концентрации в плазме крови. Увеличение содержания острофазовых гликопротеинов с относительно большой молекулярной массой – СРБ и орозомукоида – в РЖ и плазме крови при остром герпетическом стоматите свидетельствует об остроте воспаления под влиянием ВПГ слизистой оболочки полости рта. Небольшие стабильные периоды полувыведения СРБ и орозомукоида, составляющие всего от нескольких часов до нескольких дней, средняя и сильная прямая корреляционная зависимость уровня этих гликопротеинов между РЖ и плазмой крови позволяют считать эти белки чувствительными индикаторами воспаления и некроза слизистой полости рта при герпетическом стоматите. Определение концентрации СРБ и орозомукоида в РЖ и плазме крови позволяет использовать их для мониторинга активности процесса воспаления при остром герпетическом стоматите у детей. Высокий уровень α -антитрипсина в РЖ детей до и после лечения герпетического стоматита позволяет сдерживать агрессивное влияние протеаз на ткани ротовой полости, что следует расценивать как прогностически благоприятный фактор, препятствующий хроническому течению воспаления слизистой полости рта. Повышение уровня низкомолекулярных белков – преальбумина и микроальбумина – в РЖ при остром герпетическом стоматите без изменений уровня этих протеинов в плазме крови связано с увеличением проницаемости гематосаливарного барьера для низкомолекулярных белков. Это является признаком

Таблица 3

Содержание минеральных веществ в ротовой жидкости и плазме крови детей при остром герпетическом стоматите

	Контроль	Ротовая жидкость				Плазма крови			
		ОГС	Легкая степень	Средняя степень	Тяжелая степень	Контроль	ОГС	Средняя степень	Тяжелая степень
Кальций, ммоль/л	0,18 ± 0,03	0,70 ± 0,05*	0,57 ± 0,08*	0,73 ± 0,08*	0,79 ± 0,07*	2,45 ± 0,06	2,18 ± 0,16	2,23 ± 0,19	2,08 ± 0,36
Магний, ммоль/л	0,06 ± 0,02	0,35 ± 0,04*	0,26 ± 0,07*	0,27 ± 0,03*	0,61 ± 0,08*	0,84 ± 0,04	0,91 ± 0,05	0,97 ± 0,06	0,80 ± 0,08
Медь, мкмоль/л	12,87 ± 1,59	25,28 ± 3,88*	27,41 ± 3,35*	32,24 ± 6,28*	8,54 ± 1,14*	16,10 ± 0,52	22,65 ± 4,81	29,73 ± 4,96*	8,48 ± 1,69*
Цинк, мкмоль/л	3,72 ± 0,34	6,90 ± 0,46*	5,97 ± 0,96*	6,40 ± 0,53*	8,75 ± 1,01*	14,76 ± 0,8	10,92 ± 0,9*	11,73 ± 1,22	9,32 ± 0,53*

изменения базальной мембраны и эндотелия сосудистого русла и свидетельствует о прогрессирующей мембранопатии тканей полости рта. Низкий уровень трансферрина в РЖ свидетельствует о снижении антиоксидантной защиты слизистой полости рта в период разгара стоматита.

Источником увеличения содержания церулоплазмينا в РЖ является его секреция через гистогематический барьер. При остром герпетическом стоматите множественные эрозивные элементы нарушают целостность слизистой оболочки полости рта, поэтому увеличение содержания антиоксиданта церулоплазмина в РЖ и плазме крови коррелирует с тяжестью заболевания. Повышенный уровень белков острой фазы воспаления в РЖ и плазме крови детей диктует необходимость продолжения лечения герпетического стоматита.

Концентрация большинства электролитов в смешанной слюне сопоставима с их содержанием в крови, а изменение минерального состава РЖ зависит от выраженности и интенсивности процессов воспаления тканей. Внутриклеточные элементы – кальций и магний – при деструкции слизистой полости рта под влиянием ВПГ попадают в окружающие их биологические жидкости. По уровню увеличения содержания этих минеральных веществ в РЖ детей можно судить о площади деструкции, интенсивности и глубине поражения тканей полости рта под действием ВПГ. Содержание меди в РЖ и плазме крови детей повышается при легкой и средней степени тяжести заболевания, но снижается при тяжелом герпетическом стоматите. При корреляционном анализе наиболее значимые положительные связи между РЖ и плазмой крови установлены для магния, что объясняет значительное увеличение содержания этого элемента в РЖ в разгар острого герпетического стоматита. Для меди и кальция коэффициент корреляции между РЖ и плазмой крови в динамике до и после лечения детей больных острым герпетическим стоматитом остается неизменным, что и позволило разработать способ оценки эффективности лечения заболевания по биохимическому определению в РЖ соотношения концентрации меди к уровню кальция. Значение того коэффициента больше или равно 45 позволяет считать терапию острого герпетического стоматита успешной.

Заключение. При герпетической инфекции степень изменений содержания белков острой фазы воспаления и показателей минерального обмена (кальция, магния, цинка и меди) ротовой жидкости детей коррелирует со степенью тяжести стоматита. Разработан способ оценки эффективности лечения детей больных острым герпетическим стоматитом по определению содержания минеральных веществ в ротовой жидкости. Коэффициент соотношения содержания меди к кальцию в ротовой жидкости детей больше 45 следует оценивать как показатель эффективного лечения детей при герпетическом стоматите.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (pp. 2, 5, 6, 9-11, 15, 21-24, 27-30, 32-35
см. REFERENCES)

1. Елизарова В.М., Дробот'ко Л.Н., Страхова С.Ю. Острый герпетический стоматит у детей. *Пародонтология*. 2006; 41(4): 102-4.
3. Рабинович О.Ф., Рабинович И.М., Разживина Н.В. Рецидивирующий герпетический стоматит. М.: Гозтар-Медиа; 2005.
4. Яновский Л.М., Ковтонюк П.А. Острый герпетический стоматит у детей: алгоритм лечебных мероприятий. *Сибирский медицинский журнал*. 2015; 1: 126-8.
7. Петрович Ю.А., Терехина Н.А. Ферментная стратегия вируса простого герпеса. *Успехи современной биологии*. 1990; 51(1): 77-89.
8. Терехина Н.А., Реук С.Э. Биохимический анализ слезы детей при герпетическом кератите. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2003; 12: 13-6.
12. Реук С.Э., Терехина Н.А. Гликопротеины слезы и ротовой жидкости при офтальмогерпесе. *Вестник офтальмологии*. 2016; 132(1): 31-5.
13. Терехина Н.А., Реук С.Э., Петрович Ю.А. Влияние вирусной инфекции на белковый и минеральный состав слезной жидкости. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2007; 9: 75.
14. Петрович Ю.А., Терехина Н.А. Биохимия слезы и ее изменение при патологии. *Вопросы медицинской химии*. 1990; 36(3): 13-8.
16. Терехина Н.А., Петрович Ю.А., Гольдфельд Н.Г. Прогнозирование рецидивов герпетического кератита с помощью определения активности дегидрогеназ слезы. *Вестник офтальмологии*. 1988; 104(6): 42-5.
17. Терехина Н.А., Реук С.Э., Петрович Ю.А. Использование ферментного анализа слезной жидкости для прогнозирования рецидива герпетического кератита у детей. *Вестник офтальмологии*. 2007; 123(4): 23-4.
18. Терехина Н.А., Петрович Ю.А. Активность антиоксидантных ферментов и хемилуминесценция лимфоцитов периферической крови при инфицировании глаза вирусом простого герпеса. *Вопросы медицинской химии*. 1992; 38(5): 62-3.
19. Терехина Н.А., Караваев В.Г. Активность антиоксидантных ферментов эритроцитов при герпетическом кератите. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2003; 7: 38-9.
20. Петрович Ю.А., Подорожная Р.П., Киченко С.М. Гематосаливарный барьер (обзор литературы). *Российский стоматологический журнал*. 2004; 4: 39-45.
25. Петрович Ю.А., Терехина Н.А., Реук С.Э., Сухова Т.В. Прооксиданты, мексидол и другие антиоксиданты при герпетическом стоматите, гингивостоматите и хроническом генерализованном пародонтите. *Российский стоматологический журнал*. 2010; 3: 29-33.
26. Терехина Н.А., Реук С.Э., Петрович Ю.А., Атаманова Т.И. Белки острой фазы воспаления в слюне детей при герпетическом стоматите и гингивостоматите. *Российский стоматологический журнал*. 2010; 4: 17-9.
31. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск: Интерпрессервис; 2003.
36. Реук С.Э., Терехина Н.А., Атаманова Т.И. Способ оценки эффективности лечения острого герпетического стоматита у детей. Патент РФ № 2566070; 2015.
37. Реук С.Э., Терехина Н.А. Белки слизистой оболочки полости рта при экспериментальном герпетическом стоматите. *Казанский медицинский журнал*. 2015; 96(5): 854-7.

REFERENCES

1. Elizarova V.M., Drobot'ko L.N., Strahova S.Yu. Acute herpetic stomatitis in children. *Parodontologiya*. 2006; 41(4): 102-4. (in Russian)
2. Tamay Z., Ozcekert D., Onel M., Agacfidan A., Guler N. A child presenting with primary gingivostomatitis and eczema herpeticum. *Minerva Pediatr*. 2016; 68(1): 72-3.
3. Rabinovich O.F., Rabinovich I.M., Razzhivina N.V. Recurrent herpetic stomatitis. Moscow: Geotar-Media; 2005. (in Russian)

4. Yanovskiy L.M., Kovtonyuk P.A. Acute herpetic stomatitis in children: algorithm of therapeutic measures. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 1: 126-8. (in Russian)
5. Podder I., Das A. Herpetic gingivostomatitis. *Indian Pediatr*. 2014; 51(9): 764.
6. Shimomura Y. Herpes simplex virus latency, reactivation, and a new antiviral therapy for herpetic keratitis. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2008; 112(3): 247-64.
7. Petrovich Yu.A., Terekhina N.A. Herpes simplex virus enzyme strategy. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 1990; 51(1): 77-89. (in Russian)
8. Terekhina N.A., Reuk S.E. Biochemical analysis of tears in children with herpetic keratitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2003; 12: 13-6. (in Russian)
9. Terekhina N.A. Antioxidant defense in herpetic keratitis. Proceedings of the 16th International Congress of Clinical chemistry. London; UK; 1996.
10. Terekhina N.A., Petrovich Yu.A., Reuk S.E. Antioxidants of tear in viral infection. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003; 41(Suppl.): 191.
11. Terekhina N.A., Petrovich Yu.A., Solovyeva L.I. Antioxidant of tear in herpetic keratitis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2001; 39(Suppl.): 116.
12. Reuk S.E., Terekhina N.A. Glycoproteins of tears and oral fluid for ophthalmoherpes. *Vestnik oftal'mologii*. 2016; 132(1): 31-5. (in Russian)
13. Terekhina N.A., Reuk S.E., Petrovich Yu.A. The effect of viral infection on the protein and mineral composition of the tear fluid. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2007; 9: 75. (in Russian)
14. Petrovich Yu.A., Terekhina N.A. Biochemistry of a tear and its change in pathology. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1990; 36(3): 13-8. (in Russian)
15. Terekhina N.A., Petrovich Yu.A., Reuk S.E. Mineral composition of tear in viral infection. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002; 40(Suppl.): 298.
16. Terekhina N.A., Petrovich Yu.A., Gol'dfel'd N.G. Prediction of recurrence of herpetic keratitis by determining the activity of tear dehydrogenases. *Vestnik oftal'mologii*. 1988; 104(6): 42-5. (in Russian)
17. Terekhina N.A., Reuk S.E., Petrovich Yu.A. The use of enzymatic analysis of tear fluid to predict the recurrence of herpetic keratitis in children. *Vestnik oftal'mologii*. 2007; 123(4): 23-4. (in Russian)
18. Terekhina N.A., Petrovich Yu.A. The activity of antioxidant enzymes and the chemiluminescence of peripheral blood lymphocytes upon infection of the eye with herpes simplex virus. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1992; 38(5): 62-3. (in Russian)
19. Terekhina N.A., Karavaev V.G. The activity of antioxidant enzymes of red blood cells with herpetic keratitis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2003; 7: 38-9. (in Russian)
20. Petrovich Yu.A., Podorozhnaya R.P., Kichenko S.M. Hematosalivation barrier (literature review). *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal*. 2004; 4: 39-45. (in Russian)
21. Chiappin S., Antonelli G., Gatti R., de Palo E.F. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin. Chim. Acta*. 2007; 383(1-2): 30-40.
22. Pfaffe T., Cooper-White J., Beyerlein P., Kostner K., Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin. Chem*. 2011; 57(5): 675-87.
23. Sindhu S., Jagannathan N. Saliva: a cutting edge in diagnostic procedures. *Journal of oral diseases*. 2014; 168584.
24. Elizarova V.M., Petrovich Yu.A., Podorozhnaya R.P., Terekhina N.A. Calcium and other ingredients in saliva of children during various pathological conditions. Proceedings of the International Congress of Pediatric Laboratory Medicine. Estoril; Portugal; 1998.
25. Petrovich Yu.A., Terekhina N.A., Reuk S.E., Sukhova T.V. Prooxidants, mexidol and other antioxidants for herpetic stomatitis, gingivostomatitis and chronic generalized periodontitis. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal*. 2010; 3: 29-33. (in Russian)
26. Terekhina N.A., Reuk S.E., Petrovich Yu.A., Atamanova T.I. Proteins of the acute phase of inflammation in the saliva of children with herpetic stomatitis and gingivostomatitis. *Rossiyskiy stomatologicheskii zhurnal*. 2010; 4: 17-9. (in Russian)
27. Weichselbaum T.E. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am. J. Clin. Pathol.* 1946; 7: 40-9.
28. Dati F., Shumann G., Thomas L., Agnazi F., Baudner S., Bienvenu J. et al. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference range for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP reference material. *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.* 1996; 34: 517-20.
29. Bar J., Hod M., Erman A., Friedman S., Ovadia Y. Microalbuminuria: prognostic and therapeutic implications in diabetic and hypertensive pregnancy. *Diabetic Medicine*. 1995; 12: 649-56.
30. Doumas B.T., Watson W.A., Briggs H.G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin. Chim. Acta*. 1971; 31: 87-96.
31. Kamyshnikov V.S. Handbook of clinical and biochemical laboratory diagnostics. Minsk: Interpresservis; 2003.
32. Barnett R.N., Skodon S.B., Goldberg M.H. Performance of 'kits' used for clinical chemical analysis of calcium in serum. *Am. J. Clin. Pathol.* 1973; 59: 836-45.
33. Mann C.K., Yoe J.H. Spectrophotometric determination of magnesium with sodium 1-azo-2-hydroxy-3-(2,4-dimethylcarboxanilido)-naphthalene-1-(2-hydroxybenzene-5-sulfonate). *Anal. Chem.* 1956; 28: 202-5.
34. Landers J.W., Zak B. Determination of serum copper and iron in a single small sample. *Am. J. Clin. Pathol.* 1958; 29(6): 590-2.
35. Homsher R., Zak B. Spectrophotometric investigation of sensitive complexing agents for the determination of zinc in serum. *Clin. Chem.* 1985; 31(8): 1310-3.
36. Reuk S.E., Terekhina N.A., Atamanova T.I. A method for evaluating the effectiveness of treatment of acute herpetic stomatitis in children. Patent RF № 2566070; 2015. (in Russian)
37. Reuk S.E., Terekhina N.A. Proteins of the oral mucosa in experimental herpetic stomatitis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 96(5): 854-7. (in Russian)

Поступила 11.02.20

Принята к печати 06.03.20

ГЕМАТОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Захарова Н. О., Булгакова С. В., Тренева Е. В., Гусева В. М.

ОСОБЕННОСТИ АНЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА У ГЕРИАТРИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК

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

Анемический синдром определяется у 10-25% гериатрических пациентов, причем с увеличением возраста отмечена тенденция к возрастанию частоты встречаемости заболевания. Среди болезней, приводящих к развитию анемии, важную роль играет патология почек. Прогрессирующее ухудшение функции почек в старческом возрасте ассоциировано с повышенным риском переломов, саркопенией, развитием когнитивных нарушений. Также нефрогенная анемия отягощает прогноз у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, что связано с нарастанием ишемии миокарда, с увеличением тканевой гипоксии, прогрессированием гипертрофии левого желудочка, снижением систолической функции левого желудочка.

Ключевые слова: старение; хроническая болезнь почек; анемия; гипоксия; сердечно-сосудистая патология.

Для цитирования: Захарова Н. О., Булгакова С. В., Тренева Е. В., Гусева В. М. Особенности анемического синдрома у гериатрических пациентов с хронической болезнью почек. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 275-280. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-275-280>

Zakharova N.O., Bulgakova S.V., Treneva E.V., Guseva V.M.

SPECIFICITY OF ANEMIC SYNDROME IN GERIATRIC PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

Anemic syndrome is detected in 10-25% of geriatric patients, and with increasing age, there is a tendency to increase the incidence of the disease. Among the diseases that lead to the development of anemia, kidney pathology plays an important role. Progressive deterioration of kidney function in old age is associated with an increased risk of fractures, sarcopenia, and the development of cognitive impairment. Also, nephrogenic anemia aggravates the prognosis in patients with cardiovascular diseases, which is associated with an increase in myocardial ischemia, an increase in tissue hypoxia, a progression of left ventricular hypertrophy, and a decrease in left ventricular systolic function.

Key words: aging; chronic kidney disease; anemia; hypoxia; cardiovascular pathology.

For citation: Zakharova N.O., Bulgakova S.V., Treneva E.V., Guseva V.M. Specificity of anemic syndrome in geriatric patients with chronic kidney disease. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (5): 275-280 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-275-280>

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

Information about authors:

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

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

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

Guseva V.M., <http://orcid.org/0000-0003-1478-016X>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 05.03.2020

Accepted 09.03.2020

Современная демографическая ситуация характеризуется прогрессирующим увеличением продолжительности жизни и, как следствие, ростом в структуре населения лиц старших возрастных групп. Так, по прогнозам ООН, к 2050 г. ожидается удвоение популяции лиц в возрасте старше 60 лет с 11% до 22%,

что составит 2 миллиарда людей, а доля лиц в возрасте старше 80 лет увеличится в 4 раза по сравнению с 2015 г. [1].

Наиболее распространенным гематологическим синдромом, выявляемым среди лиц пожилого и старческого возраста, является анемия [2,3]. Анемический синдром определяется у 10-25% гериатрических пациентов, причем с увеличением возраста отмечена тенденция к возрастанию частоты встречаемости заболевания. Преимущественно в 75% случаев диагноз

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

анемии в гериатрической практике ставится как сопутствующее заболевание при госпитализации по поводу различных причин. При анемическом синдроме госпитализации происходят гораздо реже, примерно в 9% случаев. [4]. Так, среди госпитализированных больных старшего возраста частота выявления анемии достигает 50%, а среди амбулаторных пациентов – 20%. В настоящее время анемия признается фактором риска ряда неблагоприятных исходов у пожилых людей, включая госпитализацию, заболеваемость и смертность [2,3,5,6]. Кроме того, анемический синдром ассоциируется с развитием саркопении, снижением физической работоспособности, повышением риска падений, снижением когнитивных функций и деменцией, что обуславливает развитие и прогрессирование синдрома старческой астении у гериатрических больных [7]. Следует отметить, что большинство из этих корреляций оставались статистически значимыми после контроля множества возможных факторов, что указывает на негативное влияние именно анемии как таковой, независимо от сопутствующих хронических заболеваний, таких как хроническая болезнь почек, хроническая сердечная недостаточность и хроническое воспаление. Более того, повышенный риск смертности не ограничивался степенью тяжести анемического синдрома, а был очевиден уже при анемии легкой степени [6].

Согласно общепринятой точке зрения, анемия в гериатрической практике не связана с возрастными изменениями кровотворной ткани, а является проявлением различной патологии, рост в популяции которой обусловлен возраст-ассоциированным характером [3]. Среди заболеваний, приводящих к развитию анемии, важную роль играет патология почек. Распространенность хронической болезни почек увеличивается по мере старения организма: после 30 лет скорость клубочковой фильтрации (СКФ) прогрессивно снижается со средней скоростью 8 мл / мин / 1,73 м² за десятилетие [8]. Так, дисфункция почек выявляется у 6-14 % взрослого населения и у 20% – 56% в популяции старших возрастных групп [9, 10]. У пациентов с ХБП анемия развивается уже на ранних стадиях и встречается у 45-65% пациентов с ХБП и частота ее возрастает по мере ухудшения функции почек. По мере прогрессирования заболевания увеличивается распространенность и тяжесть анемического синдрома: если при 1 стадии ХБП анемия встречается в 8,4% случаев, то при 5 стадии – в 53,4 % [11]. Причинами анемии при ХБП являются дефицит эндогенного эритропоэтина (ЭПО), вырабатываемого почками, снижение продолжительности жизни эритроцитов, дефицит железа, который наблюдается уже у больных с 3 стадией ХБП. Нефрогенная анемия является прототипом ЭПО-дефицитного состояния [12]. При обследовании 100 пациентов среднего возраста с 3-5 стадиями ХБП абсолютный дефицит железа выявляется в 31% случаев [13]. Снижение выработки эритропоэтина почками и повышение резистентности к его действию также обусловлено вторичным гиперпаратиреозом. Прогрессирующее ухудшение функции почек приводит к повышению уровня фосфатов в сы-

воротке крови и более низкой продукции кальцитриола, что часто сочетается со снижением всасывания кальция в желудочно-кишечном тракте. Описанный каскад патологических реакций при ХБП связан с повышенным риском переломов, саркопении, когнитивных нарушений среди пациентов старших возрастных групп [7]. Следует помнить, что нефрогенная анемия отягощает прогноз у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, что связано с нарастанием ишемии миокарда, с увеличением тканевой гипоксии, прогрессированием гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ), снижением систолической функции левого желудочка (ЛЖ) [4, 14]. Анемия способствует ускорению прогрессирования, как сердечной патологии, так и ХБП. Многими авторами подчеркивается важность ранней диагностики и своевременной коррекции анемии при ХБП [15].

Сведений о частоте встречаемости и взаимосвязи между анемией и ХБП у лиц старческого возраста недостаточно, что побудило нас к проведению данного исследования.

Цель исследования – оценить выраженность анемического синдрома у пациентов старческого возраста с додиализными стадиями ХБП.

Материал и методы. Для решения поставленной цели на базе ГБУЗ «Самарский областной клинический госпиталь для ветеранов войн» было проведено проспективное исследование 135 человек: 69 мужчин (51,1%) и 66 женщин (48,9%) в возрасте от 75 до 90 лет (средний возраст $83,2 \pm 0,70$ лет) с додиализной стадией ХБП.

Диагноз и степень тяжести ХБП определяется величиной СКФ и показателями альбуминурии/протеинурии. В зависимости от уровня СКФ различают 5 стадий ХБП: 5 стадия – менее 15 мл/мин/1,73 м², 4 стадия – 15-29 мл/мин/1,73 м², 3А стадия – 45-59 мл/мин/1,73 м², 3Б стадия – 30-44 мл/мин/1,73 м², 2 стадия – 60-89 мл/мин/1,73 м², 1 стадия – СКФ более 90 мл/мин/1,73 м². Деление 3-ей стадии на две подстадии связано с различным прогнозом. Считается, что при 3А стадии выше риск летальных сердечно-сосудистых осложнений, а при 3Б стадии более вероятно развитие терминальной почечной недостаточности [16].

Пациентам проводилось клиническое, лабораторное и инструментальное обследование.

Критерием включения пациентов в исследование было наличие ХБП, подтвержденной клиническими, лабораторными и инструментальными данными (определение СКФ по формуле CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) в пределах от 15 до 90 мл/мин/1,73 м²) [17]. При ультразвуковом исследовании критериями повреждения почек являлись: уменьшение размеров почек, расширение чашечно-лоханочной системы, уменьшение кортико-медуллярной дифференцировки, деформация чашечек, наличие кист, конкрементов.

Диагноз анемии ставился больным в соответствии с критериями ВОЗ (при снижении гемоглобина крови ниже 130 г/л у мужчин и 120 г/л у женщин).

К критериям исключения из исследования отно-

сились: системные заболевания с поражением почек; терминальная и острая и почечная недостаточность; единственная почка; стенокардия напряжения IV функционального класса по классификации Канадской ассоциации кардиологов; сахарный диабет, онкологические заболевания, инфаркт миокарда; хроническая сердечная недостаточность III-IV ФК (по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации – NYHA), все формы фибрилляции предсердий, бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких.

Все пациенты получали терапию согласно Российским клиническим рекомендациям и протоколам.

Исследуемую группу (1) составили лица старческого возраста – 131 пациент в возрасте от 75 до 89 лет и 4 долгожителя в возрасте 90 лет. Пациенты были разделены на 4 подгруппы по уровню СКФ, рассчитанному по уравнению СКД-ЕРІ по креатинину сыворотки крови (2009 г., модификация 2011 г.). Группу контроля (2) составили 33 пациента (СКФ – 60 мл/мин/1,73 м² и выше, средний уровень СКФ 69,82 ± 1,74 мл/мин/1,73 м²), т.е. с 1 и 2 стадиями ХБП, возраст пациентов 75-89 лет: 17 мужчин (51,52 %) и 16 женщин (48,48%) (средний возраст 81,82 ± 0,76 лет); 2 группу составили 33 пациента с 3А стадией ХБП: 17 мужчин (51,52%) и 16 женщин (48,48%) (СКФ 45-59 мл/мин/1,73 м² (средний уровень 52,58 ± 0,72 мл/мин/1,73 м²), в возрасте 75-89 лет (средний возраст 83,58 ± 0,72 лет).

В 3 группу были включены 35 пациентов с 3Б стадией ХБП в возрасте 78-88 лет (средний возраст 83,69 ± 0,46 лет). СКФ у них соответствовала 30-44 мл/мин/1,73 м² (средний уровень 40,20 ± 0,67 мл/мин/1,73 м²), из них 18 мужчин (51,43%) и 17 женщин (48,57%). 4 группу составили 34 пациента старческого возраста 75-90 лет, средний возраст – 83,76 ± 0,81 лет, СКФ в данной группе – 15-29 мл/мин/1,73 м² (средний уровень 24,44 ± 0,79 мл/мин/1,73 м²), что соответствует 4 стадии ХБП, из них 17 мужчин (50 %) и 17 женщин (50 %). Соотношение мужчин и женщин во всех группах было 1:1 или 1:1,06. Разница по возрастному составу между группами не достоверны ($p_{1-2} = 0,295$, $p_{1-3} = 0,232$, $p_{1-4} = 0,205$, $p_{2-3} = 0,999$, $p_{2-4} = 0,998$, $p_{3-4} = 1,0$).

Всем обследуемым измеряли массу тела и рост с помощью медицинских весов и медицинского ростомера с точностью до 0,1 кг. Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывали по формуле Кетле. Биохимические показатели крови изучались на анализаторе ChemWell (Awareness Technology, США), реактивы Human (Германия). Исследование креатинина крови выполняли по методу Яффе с щелочным пикратом (нормальные значения до 123 мкмоль/л), мочевины – иммуноферментным методом. Определение цистатина С проводили с помощью реактива BioVendor (Чешская Республика). Проводили исследование клинического анализа крови на гематологическом анализаторе Abacus (Diatron, Австрия). Биохимические показатели сыворотки крови исследовались на анализаторе ChemWell (Awareness Technology, Inc.USA) с помощью реактивов Human (Германия). Исследование креатинина

крови выполняли по методу Яффе с щелочным пикратом (нормальные значения до 123 мкмоль/л), мочевины – иммуноферментным методом. Определение цистатина С проводили с помощью реактива BioVendor (Чешская Республика). Концентрация сывороточного железа определялась иммуноферментным методом с помощью прибора Stat Fax-2600 (США); интактный ПТГ (иПТГ) оценивался с помощью реактива ELISA, Biomerica (США) (референсные значения – 10-65 пг/мл), эритропоэтин изучался с помощью реактива ELISA, Biomerica (США) (референтный интервал 5,0-36,0 МЕ/мл), с помощью реактива АлкорБио (Россия) исследовали уровень ферритина.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения: SPSS 21 (лицензия № 20130626-3). В качестве описательных статистик представлены среднее арифметическое и его ошибка ($M \pm m$) или стандартное отклонение ($M \pm SD$). Критическое значение уровня значимости принимали равным 0,05.

Результаты. Показатели креатинина крови у обследованных имели средние значения 124,48 ± 49,37 мкмоль/л (59-288 мкмоль/л, ДИ 95% 116,07-132,88 мкмоль/л), показатели цистатина С – 1,54 ± 0,56 мг/л (0,66 – 2,78 мг/л, ДИ 95% 1,43-1,63 мг/л).

Анемический синдром регистрировался у 73,3% обследованных больных, из которых 48 женщин и 51 мужчина. Распространенность анемии закономерно возрастала при снижении СКФ, она регистрировалась у 97,1% ($n=33$) больных с 4 стадией ХБП, у 85,7 % ($n=30$) больных с 3Б стадиями ХБП, у 66,7% ($n=22$) больных с 3А стадией ХБП. Полученные результаты представлены в таблице. По показателям эритроцитарных индексов видно, что анемия у обследованных больных была нормохромной и нормоцитарной. Средние показатели эритроцитарных индексов МСН (среднее содержание гемоглобина в эритроцитах) и MCV (средний объем эритроцитов) во всех группах сравнения оказались практически на одном уровне. Средние значения концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС) достоверно снижаются при СКФ < 30 мл/мин/1,73 м² по сравнению с контрольной и 2 группами. Достоверное снижение гематокрита было зарегистрировано в 4-й группе по сравнению с контрольной и в 3 группе среди мужчин по сравнению с контрольной группой.

У пациентов с 4 стадией ХБП установлено достоверное снижение концентрации гемоглобина крови как среди мужчин, так и среди женщин по сравнению с пациентами с 1-2 стадий ХБП, 3А и 3 Б стадией ХБП на 19,7 % ($p < 0,001$), 16,23 % ($p < 0,001$) и 11,37 % ($p = 0,013$), у пациентов с 3Б стадией ХБП снижение гемоглобина крови по сравнению с контрольной группой составило 9,39 % ($p = 0,001$). В 4 группе пациентов зарегистрировано снижение числа эритроцитов по сравнению с пациентами всех остальных групп: с контрольной группой на 11,78 % ($p < 0,001$), со 2 группой – на 9,6% ($p = 0,002$), с 3 группой – на 7,79 % ($p = 0,025$). Снижение концентрации гемоглобина и числа эритроцитов крови было более значимым среди мужчин, нежели среди женщин.

Показатели красной крови, эритропоэтина, ферритина, сывороточного железа у пациентов старческого возраста в зависимости от СКФ (M±m) (n=135)

Показатели	1 группа СКФ ≥ 60 мл/мин/1,73м ² n=33	2 группа СКФ 45-59 мл/мин/1,73м ² n=33	3 группа СКФ 30-44 мл/мин/1,73м ² n=35	4 группа СКФ 15-29 мл/мин/1,73м ² n=34
Гемоглобин, г/л	126,52±2,11	121,28±2,25	114,64±1,55 ^а	101,6±1,95**## [^]
Мужчины	131,88±2,82	125,24 ± 3,28	116,0 ± 2,39 ^а	104,29± 2,9**##
Женщины	120,1±2,53	116,56 ± 2,32	113,35 ± 1,84	100,12±2,68**#
Эритроциты, x10 ¹² /л	4,16±0,08	4,06±0,07	3,98±0,06	3,67±0,09**# [^]
Мужчины	4,25 ± 0,12	4,15 ± 0,09	3,96 ± 0,09	3,64 ± 0,13*#
Женщины	4,07 ± 0,11	3,97 ± 0,10	3,99 ± 0,07	3,69 ± 0,13
Гематокрит, %	39,43±0,73	38,72±0,60	37,51±0,57	36,67±0,75*
Мужчины	41,08 ± 1,12	40,0 ± 0,77	37,57 ± 0,74 ^а	37,26±1,02*
Женщины	37,68 ± 0,74	37,35±0,82	37,44 ± 0,88	36,08 ± 1,12
МСН, пг	30,09±0,42	29,92±0,46	29,37±0,33	29,34±0,45
Мужчины	30,34±0,54	30,51±0,61	29,73±0,52	30,12±0,76
Женщины	29,84±0,67	29,29±0,68	28,99±0,38	28,57±0,44
MCV, фл	96,06±0,91	96,00±1,13	94,46±1,01	94,15±1,15
Мужчины	97,71±0,98	97,41±1,65	96,17 ± 1,67	95,88±1,15
Женщины	94,31±1,47	94,50±1,48	92,65±0,96	92,41±1,93
МСНС, г/л	319,03±2,78	311,52±2,89	309,94±2,86	300,6±2,58**#
Мужчины	318,65±4,1	318,12±3,59	314,44±4,49	300,29±3,2*#
Женщины	319,44±3,6	304,5±3,97 ^а	305,18±3,21 ^а	300,94±4,14*
Железо, мкмоль/л	16,28±0,92	13,25±1,25	15,02±1,28	13,58±2,18
Мужчины	16,8 ± 1,3	14,9 ± 1,6	16,1± 1,4	13,69 ± 2,3
Женщины	16,1 ± 0,8	12,8 ± 1,1	14,3 ± 1,3	13,1 ± 1,9
Ферритин, мкг/л	86,97±5,92	87,56±16,98	77,38±8,82	68,03±8,08
Мужчины	88,6 ± 6,4	88,1 ± 12,4	78,56 ± 8,0	68,6 ± 7,8
Женщины	85,5 ± 5,5	86,4 ± 10,1	76,34 ± 7,8	66,9 ± 8,4
ЭПО, МЕ/мл	8,29±1,42	7,35±1,93	4,98±0,74	3,55±0,51*
Мужчины	8,68 ± 1,3	7,41±1,98	5,1± 0,71	3,9±0,66
Женщины	8,17 ± 1,5	6,9 ± 0,89	4,6 ± 0,85	4,0 ± 0,5

Примечание. * – $p < 0,05$ -статистическая значимость различий по сравнению 4 группы с контрольной группой; ** – $p < 0,001$ – статистическая значимость различий по сравнению 4 группы с контрольной группой; # – $p < 0,05$ -статистическая значимость различий по сравнению 4 группы со 2 группой; ## – $p < 0,001$ -статистическая значимость различий по сравнению 4 группы со 2 группой; ^ – $p < 0,05$ – статистическая значимость различий по сравнению 4 группы с 3 группой; ^а – $p < 0,05$ -статистическая значимость различий по сравнению 3 группы с контрольной группой; ^х – $p < 0,05$ -статистическая значимость различий по сравнению 2 группы с контрольной группой.

Показания к назначению эритропоэтина были установлены у 18 (52,9 %) пациентов в 4 группе, у 7 (20%) пациентов в 3 группе и у 4 (12,1%) пациентов во 2 группе. В контрольной группе ни один пациент не имел уровень гемоглобина ≤ 100 г/л.

Было выявлено, что средние значения концентрации железа сыворотки крови находились в пределах нормальных значений во всех группах больных. Средние показатели содержания ферритина сыворотки крови во всех группах пациентов находились на уровне ниже 100 мкг/л, что было расценено как дефицит железа, который выявился у 63,6 % ($n=21$) пациентов 1-й группы, у 66,7 % ($n=22$) больных 2-й группы, у 62,9% ($n=22$) пациентов 3-ей группы и у 85,3 % ($n=29$) – 4-й группы. У пациентов 1 и 2 групп средние показатели ЭПО были в пределах нормальных значений, а дефицит ЭПО (снижение уровня ниже 5 МЕ/мл) выявлялся у пациентов 3 и 4 групп. Абсолютный дефицит ЭПО был установлен у 27

(79,4%) пациентов 4-й группы, у 23 больных (65,7%) 3-ей группы, у 20 пациентов (60,6%) 2-й группы и у 12 обследованных (36,4 %) контрольной группы. Было неожиданно выявление дефицита железа более чем у 60 % больных и дефицита ЭПО более чем у трети пациентов в контрольной группе. Дисперсионный анализ установил зависимость от пола показателей эритроцитарных индексов (МСН и MCV), гемоглобина, гематокрита, которые были достоверно выше у мужчин, чем у женщин ; $F=5,87$ при $p=0,017$; $F=10,45$ при $p=0,002$, $F=15,79$ при $p=0,000$; $F=8,05$ при $p=0,005$). Зависимости уровня железа и ферритина, ЭПО в сыворотке крови от пола установлено не было.

При определении корреляционных связей выявлена обратная зависимость уровня гемоглобина от показателей цистатина С ($r = -0,59$, $p=0,000$), креатинина ($r = -0,58$, $p=0,000$), мочевины ($r = -0,54$, $p=0,000$), иПТГ ($r = -0,51$, $p=0,000$). Установлена прямая зави-

симость от всех 7 показателей СКФ ($r = 0,46 - 0,63$ при $p=0,000$), с наибольшей зависимостью от СКФ по формуле MDRD. Корреляционная зависимость количества эритроцитов от вышеперечисленных показателей была менее значимой: от цистатина С ($r = -0,41$, $p < 0,05$), креатинина ($r = -0,40$, $p < 0,05$), мочевины ($r = -0,34$, $p < 0,05$), иПТГ ($r = -0,36$, $p < 0,05$), показателей СКФ ($r = 0,31 - 0,35$ при $p < 0,05$), с наибольшей зависимостью от СКФ по СКД-EPICr. Корреляционная зависимость от СКФ по всем формулам среди эритроцитарных индексов была выявлена только для MCHC ($r = 0,248 - 0,359$ при $p < 0,01$), с наибольшим значением для СКФСД-EPICr. От уровня СКФ по формулам MDRD ($r = 0,248$, $p = 0,004$), СКД-EPICr ($r = 0,243$, $p = 0,005$), КК по К-Г ($r = 0,239$, $p = 0,006$) имел прямую зависимость показатель ЭПО.

Обсуждение. Одним из осложнений ХБП является анемия, которая была выявлена нами у 73,3% всех обследованных больных, что не противоречит проведенным ранее исследованиям [2,4].

Распространенность анемии при 1-2 стадиях ХБП составила 45,5% и возростала по частоте при ухудшении функции почек. Так, при 4 стадии ХБП анемия регистрировалась уже у 97,1% больных. Подобная тенденция согласуется с опубликованными ранее данными [18]. Наше исследование доказало, что микроцитоз не является надежным маркером дефицита железа у лиц старших возрастных групп: на фоне анемического синдрома средний объем эритроцитов у пациентов оставался в пределах нормальных значений. Полученные нами результаты не противоречат данным, полученным в серии исследований из 4117 пациентов с анемией в возрасте старше 65 лет: только у 26,9% пациентов с абсолютным дефицитом железа было снижение MCV, тогда как MCV было нормальным у 68,9% и увеличилось у 4,2% [19]. Подобная тенденция сохраняется и в отношении ферритина: у лиц старших возрастных групп он не может быть основным критерием диагностики дефицита железа, так как его уровни, как правило, возрастают с самим возрастом, а также являются маркером сопутствующих воспалительных заболеваний [20]. Таким образом, важно отметить, что классические пороги ферритина для желездефицитной анемии у молодых менее 15–20 мкг/л не могут автоматически использоваться у лиц старших возрастных групп. Однако тенденция по снижению уровня ферритина прослеживалась по мере прогрессирования ХБП: уровень ферритина ниже 100 мкг/л выявлен более, чем у 60% пациентов 1–3 групп сравнения и у 85,3% в 4 группе. Прогрессирующее снижение ЭПО по средним значениям в группах мы выявили у пациентов с СКФ < 45 мл/мин/1,73 м², однако абсолютный дефицит ЭПО был выявлен у 36,4% пациентов с 1-2 стадиями ХБП и у 60,6% пациентов с 3А стадией ХБП, что не противоречит данным иностранных авторов [21, 22].

Таким образом, проведенное нами исследование отражает высокую распространенность анемического синдрома у пациентов старческого возраста с ХБП. Нефрогенная анемия регистрируется при СКФ ни-

же 60 мл/мин/1,73м², достоверно нарастая при дальнейшем снижении функции почек, а при СКФ выше 60 мл/мин/1,73м² более, чем у половины пациентов регистрируется дефицит железа и более, чем у трети пациентов – дефицит ЭПО. Анализ лабораторных данных показал многофакторный характер анемии. Системная гипоксия на фоне имеющейся полиморбидности способствует утяжелению имеющейся сопутствующей патологии у пациентов старших возрастных групп. Своевременное лечение основного заболевания и коррекция анемии способны улучшить качество жизни и прогноз пациентов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 5-9, 11-16, 18-22 см. REFERENCES)

2. Богданов А.Н., Семелев В.Н., Тыренко В.В., Козлов К.Л. Анемический синдром и его особенности у пациентов пожилого и старческого возраста. *Успехи геронтологии*. 2015; 28 (1): 124-31.
4. Ларина В.Н., Барт В.Я., Распопова Т.Н., Ларин В.Г. Хроническая сердечная недостаточность и сопутствующие заболевания в пожилом возрасте: анемия и кардиоренальный анемический синдром. *Кардиология*. 2014; 5: 22-8.
10. Захарова Н. О., Булгакова С. В., Тренева Е. В., Николаева А.В., Романчук П. И., Нестеренко С. А. Особенности определения и прогностическое значение скорости клубочковой фильтрации у лиц старших возрастных групп с сердечно-сосудистой патологией. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65 (2): 77-83.
17. Мухин Н.А. Нефрология. Национальное руководство. Краткое издание. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018.

REFERENCES

1. Global AgeWatch Index 2015. URL: <http://www.helpage.org/global-agewatch/reports/global-agewatch-index-2015-insight-report-summary-and-methodology>.
2. Bogdanov A.N., Semelev V.N., Tyrenko V.V., Kozlov K.L. Anemic syndrome and its features in elderly and senile patients. *Uspekhi gerontologii*. 2015; 28 (1): 124-31. (in Russian)
3. Merchant A.A., Roy C.N. Not so benign haematology: anaemia of the elderly. *Br. J. Haematol*. 2012; 156(2): 173-85.
4. Larina V.N., Bart V.Ya., Raspopova T.N., Larin V.G. Chronic heart failure and concomitant diseases in the elderly: anemia and cardiorenal anemia syndrome. *Kardiologiya*. 2014; 5: 22-8. (in Russian)
5. Yi S.W., Moon S.J., Yi J.J. Low-normal hemoglobin levels and anemia are associated with increased risk of end-stage renal disease in general populations: A prospective cohort study. *PLoS One*. 2019; 14(4): e0215920.
6. Zakai N.A., Katz R., Hirsch C., Shlipak M.G., Chaves P.H., Newman A.B., et al. A prospective study of anemia status, hemoglobin concentration, and mortality in an elderly cohort: the cardiovascular health study. *Arch. Intern. Med*. 2005; 165: 2214-20.
7. Stauder R., Valent P., Theurl I. Anemia at older age: etiologies, clinical implications and management. *Blood*. 2017; 131: 505-14.
8. Andres E., Serraj K., Federici L., Vogel T., Kaltenbach G. Anemia in elderly patients: new insight into an old disorder. *Geriatr. Gerontol. Int*. 2013; 13: 519-27.
9. Sharma D., Suri V., Pannu A.K., Attri S.V., Varma N., Kochhar R. et al. Patterns of geriatric anemia: A hospital-based observational study in North India. *J. Family Med. Prim. Care*. 2019; 8(3): 976-80.
10. Zakharova N.O., Bulgakova S.V., Treneva E.V., Nikolaeva A.V., Romanchuk P.I., Nesterenko S.A. Specificity of estimation and prognostic value of glomerular filtration rate in older age groups with car-

- diovascular pathology. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65 (2): 77-83. (in Russian)
11. Ishani A., Grandits G.A., Grimm R.H., Svendsen K.H., Collins A.J., Prineas R.J. et al. Association of single measurements of dipstick proteinuria, estimated glomerular filtration rate, and hematocrit with 25-year incidence of end-stage renal disease in the multiple risk factor intervention trial. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006; 17: 1444–52.
 12. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int. Suppl. (2011)*. 2012; 2: 279–335.
 13. Iseki K., Ikemiya Y., Iseki C., Takishita S. Haematocrit and the risk of developing end stage renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18: 899–905.
 14. Morkedal B., Laugsand L.E., Romundstad P.R., Vatten L.J. Mortality from ischaemic heart disease: sex-specific effects of transferrin saturation, serum iron, and total iron binding capacity. The HUNT study. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 2011; 18: 687-94.
 15. Fu Q., Colgan S.P., Shelley C.S. Hypoxia: The Force that Drives Chronic Kidney Disease. *Clin. Med. Res.* 2016; 14: 15–39.
 16. Mok Y., Matsushita K., Sang Y., Ballew S.H., Grams M., Shin S.Y., et al. Association of Kidney Disease Measures with Cause-Specific Mortality: The Korean Heart Study. *PLoSOne*. 2016; 11: e0153429.
 17. Mukhin N.A. Nephrology. National leadership. Brief edition [Nefrologiya. Natsional'noe rukovodstvo]. Moscow: GEOTAR-Media; 2018. (in Russian)
 18. Formiga F., Ferrer A., Cruzado J.M., Padros G., Fanlo M., Roson B. et al. Geriatric assessment and chronic kidney disease in the oldest old: the Octabaix study. *Eur. J. Intern. Med.* 2012; 23(6): 534-8.
 19. Bach V., Schruckmayer G., Sam I., Kemmler G., Stauder R. Prevalence and possible causes of anemia in the elderly: a cross-sectional analysis of a large European university hospital cohort. *Clin. Interv. Aging.* 2014; 9: 1187–96.
 20. Hillman R. Iron-Deficiency Anemia. Hematology in Clinical Practice. 5th ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical; 2011.
 21. Price E.A., Mehra R., Holmes T.H., Schrier S.L. Anemia in older persons: etiology and evaluation. *Blood Cells Mol. Dis.* 2011; 46: 159–65.
 22. Ferrucci L., Guralnik J.M., Bandinelli S., Semba, R.D., Lauretani, F., Corsi, A., et al. Unexplained anaemia in older persons is characterised by low erythropoietin and low levels of pro inflammatory markers. *Br. J. Haematol.* 2007; 136: 849–55.

Поступила 05.03.20

Принята к печати 09.03.20

КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Садов Р.И., Панова И.А., Назаров С.Б., Кузьменко Г.Н., Клычева М.М.

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТРОМБОЭЛАСТОГРАФИИ И ФУНКЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ РАССТРОЙСТВ В III ТРИМЕСТРЕ БЕРЕМЕННОСТИ

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава РФ, 153045, г. Иваново, Россия

Данная работа посвящена изучению гемостаза у беременных женщин с различными формами гипертензивных расстройств в III триместре беременности. Обследовано 165 женщин в сроке 26–41 недель беременности. Из них 22 женщины с умеренной преэклампсией, 31 с тяжелой преэклампсией, 45 женщин с хронической артериальной гипертензией, 20 женщин с преэклампсией, развившейся на фоне хронической артериальной гипертензии, 47 женщин без гипертензивных расстройств (группа контроля). Оценка состояния системы гемостаза осуществлялась по результатам тромбоэластографии, индуцированной агрегации тромбоцитов с АДФ и адреналином в дозе 1,25 и 2,5 мкг/мл и коллагеном в дозе 20 мг/мл, секреции тромбоцитами АТФ и средней концентрации компонентов тромбоцитов. Тромбоэластография выполнена на тромбоэластографе TEG® 5000 (Haemoscope Corporation, USA). Исследование агрегации тромбоцитов и секреции тромбоцитами АТФ выполнено на автоматическом агрегометре CHRONO-LOG® Model 700 (USA). Уровень средней концентрации компонентов тромбоцитов определялся на автоматическом гематологическом анализаторе SIEMENS ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA). Результаты исследования параметров тромбоэластограммы показали снижение активности плазменного звена гемостаза во всех группах женщин с гипертензивными расстройствами. У женщин с умеренной преэклампсией и хронической артериальной гипертензией функциональная активность тромбоцитов не изменялась по сравнению с контрольной группой. При тяжелой преэклампсии выявлено нарушение процесса дегрануляции плотных гранул тромбоцитов и снижение их агрегационной способности. У женщин с преэклампсией, возникшей на фоне хронической артериальной гипертензии, отмечено снижение индуцированной адреналином агрегации тромбоцитов. Изучение параметров тромбоэластографии (R, K, угол α , TMA, Cl, LY30) может быть полезно для дифференциальной диагностики тяжелой преэклампсии и хронической артериальной гипертензии. Результаты исследования позволили сделать вывод о целесообразности использования низких доз АДФ и адреналина в качестве индукторов агрегации тромбоцитов с учетом их гранулоцитарности и способности к секреции АТФ.

Ключевые слова: беременность; преэклампсия; артериальная гипертензия; гемостаз; агрегация тромбоцитов; средняя концентрация компонентов тромбоцитов; секреция АТФ; тромбоэластография.

Для цитирования: Садов Р.И., Панова И.А., Назаров С.Б., Кузьменко Г.Н., Клычева М.М. Изменения показателей тромбоэластографии и функции тромбоцитов у беременных женщин с различными формами гипертензивных расстройств в III триместре беременности. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 281-288

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-281-288>

Sadov R.I., Panova I.A., Nazarov S.B., Kuzmenko G. N., Klycheva M.M.

CHANGES IN THE INDICATORS OF THROMBOELASTOGRAPHY AND PLATELET FUNCTION IN PREGNANT WOMEN WITH VARIOUS FORMS OF HYPERTENSIVE DISORDERS IN THE THIRD TRIMESTER OF PREGNANCY

Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood named after V.N. Gorodkov, 153045, Ivanovo, Russian Federation

The aim of this research is the study of haemostasis of pregnant women suffering from various forms of hypertensive disorders in their III trimester of pregnancy. 165 women at 26–41 weeks of pregnancy were examined: 22 women had moderate preeclampsia, 31 had severe preeclampsia, 45 women suffered from chronic hypertension, 20 women have developed preeclampsia on the background of chronic hypertension and 47 women had no hypertensive disorders (control group). The hemostasis system has been assessed using the results of the following investigations: thromboelastography, induced platelet aggregation with ADP and adrenaline at a dosage of 1.25 and 2.5 μ g/ml respectively and collagen at a dosage of 20 mg/ml, platelet ATP secretion and the average concentration of platelet components. Thromboelastography has been performed using TEG® 5000 thromboelastograph (Haemoscope Corporation, USA). The study of platelet aggregation and platelet ATP secretion has been performed at automatic aggregometer CHRONO-LOG® Model 700 (USA). The mean platelet component concentration has been measured using SIEMENS ADVIA 2120i automated hematology analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA). Thromboelastogram analysis showed a decrease in the plasma hemostasis activity in all groups of women with hypertensive disorders. The functional activity of platelets of women with moderate preeclampsia and chronic arterial hypertension did not change in comparison with the control group. The disorder of dense platelet granules degranulation and decrease in their aggregation ability have been detected in a cohort with severe preeclampsia. The decrease in adrenaline induced platelet aggregation has been noted in the group of women suffering from preeclampsia on the background of chronic arterial hypertension. Thromboelastography analysis (R, K,

angle α , TMA, CI, LY30) may be useful for the differential diagnosis of severe preeclampsia and chronic arterial hypertension. The results of the study led to the conclusion that it is advisable to use low doses of ADP and adrenaline as inducers of platelet aggregation, considering their granulocyticity and the ability to secrete ATP.

Key words: *pregnancy; preeclampsia; arterial hypertension; hemostasis; platelet aggregation; mean platelet component concentration; ATP secretion; thromboelastography.*

For citation: *Sadov R.I., Panova I.A., Nazarov S.B., Kuzmenko G. N., Klycheva M.M. Changes in the indicators of thromboelastography and platelet function in pregnant women with various forms of hypertensive disorders in the third trimester of pregnancy. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (5): 281-288. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-281-288>*

For correspondence: *Sadov R.I.*, postgraduate student of the Department of obstetrics and gynecology, neonatology, anesthesiology and resuscitation; e-mail: mail4Ruslan@mail.ru

Information about authors:

Sadov R.I., orcid.org/0000-0002-8776-7743

Panova I.A., orcid.org/0000-0002-0828-6547

Nazarov S.B., orcid.org/0000-0003-1545-7655

Kuzmenko G.N., orcid.org/0000-0001-5772-9271

Klycheva M.M., orcid.org/0000-0002-1725-8505

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 31.01.2020
Accepted 20.02.2020

Актуальность. Несмотря на положительную динамику в вопросах снижения показателей материнской и детской смертности за последние годы по данным всемирной организации здравоохранения частота предотвратимых материнских потерь во время беременности, родов и послеродового периода по наиболее распространенным причинам – кровотечениям, сепсису и артериальной гипертензии в 2015 году составила 52%. [1]. Огромный вклад этих патологических состояний в структуру материнских потерь определяет основные направления для детального изучения этиопатогенеза этих состояний и совершенствования профилактических мер и лечения беременных женщин.

В развитых странах частота встречаемости повышенного артериального давления во время беременности составляет от 8 до 22% [2, 3], в России, по данным разных авторов, от 6,9 до 29% [4, 5]. Преэклампсия (ПЭ) осложняет от 2 до 8% всех беременностей [6], хроническая артериальная гипертензия (ХАГ) около 5% [7]. У 16-78% женщин с ХАГ происходит присоединение ПЭ [8, 9].

Преэклампсия – одна из “загадок беременности”. На сегодняшний день нет единого мнения в отношении этиопатогенетических механизмов развития этого грозного состояния, что осложняет выбор превентивной, патогенетической и симптоматической терапии. Однако, благодаря многочисленным исследованиям в этой области, все же удалось выявить некоторые “обязательные” звенья патогенеза ПЭ. По результатам большого количества научных работ доказано, что центральным звеном патогенеза ПЭ является эндотелиальная дисфункция [10–12]. При хронической артериальной гипертензии так же отмечается вовлечение эндотелия в патологический процесс, о чем свидетельствует повышенный интерес к проблеме врачей и ученых кардиологического профиля [13, 14]. При гипертензивных нарушениях во время бе-

реженности отмечается не только повреждение внутренней выстилки сосудов, но и мембран форменных элементов крови, в частности тромбоцитов – клеток, играющих большую роль в процессах гемокоагуляции [15, 16]. Нарушения в процессах свертывания крови способны приводить к тяжелым осложнениям: ДВС – синдрому, кровотечениям, тромбозам [17–19]. Вопросам гемостаза при нормально протекающей беременности и осложненной гипертензивным расстройством уделяется пристальное внимание. На сегодняшний день немало исследований посвящено изучению параметров системы гемостаза у беременных женщин с различными формами гипертензивных расстройств, однако, полученные результаты были нередко противоречивы [20–22]. Изменения параметров гемостаза при ПЭ, развившейся на фоне уже имеющейся гипертонической болезни и референсные диапазоны значений некоторых параметров гемостаза в III триместре при нормально протекающей беременности до сих пор не определены.

В настоящее время доступность различных методов оценки нарушений свертывания крови и разнообразие современных приборов позволяет дополнить имеющиеся представления об изменениях в системе гемостаза у женщин с физиологической и осложненной беременностью, при этом предпочтение отдается менее трудоемким и доступным методам.

Целью исследования явилось изучение состояния плазменного и тромбоцитарного звеньев системы гемостаза у женщин в III триместре беременности с различными формами гипертензивных расстройств на основании показателей тромбоэластографии, агрегации тромбоцитов, секреции тромбоцитами АТФ и тромбоцитограмм.

Материал и методы. Исследование проводилось на базе ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства им. В.Н. Городкова» Минздрава РФ в лаборатории клинической

биохимии и генетики. В исследование вошло 165 женщин при беременности 26-41 недель. 1-ю группу составили 22 женщины с умеренной ПЭ (код по МКБ-Х О14.0), 2-ю – 31 женщина с тяжелой ПЭ (код по МКБ-Х О14.1), в 3-ю вошли 45 женщин с ХАГ (код по МКБ-Х О10.0), 4-я группа состояла из 20 женщин с ХАГ, осложнившейся присоединением ПЭ (код по МКБ-Х О10.0). Группу контроля составили 47 женщин без гипертензивных расстройств. Все женщины подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Локальный этический комитет одобрил проведение данного исследования (протокол заседания № 3 от 27.11.2017 г.). Критерии исключения: прием нестероидных противовоспалительных препаратов, дезагрегантов, антикоагулянтов, ингибиторов фибринолиза в последние 2 нед до забора крови; вторичная артериальная гипертензия (код по МКБ-Х О10.1, О10.2, О10.3, О10.4, О10.9); острые или обострение хронических воспалительных заболеваний; врожденные и приобретенные пороки сердца и магистральных сосудов. Диагностика различных нозологических форм гипертензивных расстройств при беременности проводилась в соответствии с действующими клиническими рекомендациями «Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия» (2016).

Исследование показателей гемостаза осуществлялось методом тромбоэластографии на автоматическом тромбоэластографе TEG® 5000 (Haemoscore Corporation, USA) и автоматическом агрегометре CHRONO-LOG® Model 700 (USA). Материалом для исследования послужила периферическая венозная кровь. Взятие крови для всех исследований производили из локтевой вены утром натощак до начала терапии. Для тромбоэластографии взятие крови осуществляли в пробирки с 3,2 % раствором цитратом натрия AQUISEL 9NC / CITRATE 3Na в объеме 1 мл, рекальцификация цельной крови производилась путем добавления 20 мкл 0,2 М раствора хлорида кальция к 340 мкл цитратной крови, далее исследование проводилось согласно инструкции к прибору.

Тромбоэластограмма (ТЭГ) оценивалась по параметрам, характеризующим процесс образования и лизиса сгустка. Параметр R (мин) отражает время от момента начала пробы до образования первых нитей фибрина и характеризует фазу инициации свертывания крови, соответствует прямой от начала записи до расширения ветвей ТЭГ на 1 мм. К (мин) – время достижения фиксированного уровня прочности сгустка, соответствует отрезку от момента расширения в 1 мм до амплитуды в 20 мм. α (°) – угол, построенный по касательной к ветвям расширения из точки начала образования сгустка, характеризует скорость роста фибриновой сети и фазу распространения коагуляции. Показатель характеризует динамику процесса фибринообразования и уровень фибриногена. МА (мм) – максимальная амплитуда, отражает максимальную прочность сгустка, обусловлена количеством и функциональными свойствами тромбоцитов и количеством фибриногена; соответствует макси-

альному расхождению ветвей тромбоэластограммы. ТМА (мин) – время достижения максимальной амплитуды. G (d/sc) и E (d/sc) характеризуют соответственно максимальную прочность и эластичность сгустка. CI – коагуляционный индекс, синтетический показатель, отражающий коагуляционный потенциал крови в целом, зависящий от показателей R, K, MA и угла α . LY30 (%) – процент, на который происходит уменьшение площади между ветвями ТЭГ в течение 30 минут после достижения МА.

Оценка функциональной активности тромбоцитов выполнялась при помощи метода исследования агрегации тромбоцитов, оценки уровня секреции аденозинтрифосфата (АТФ) и уровня гранулоцитарности тромбоцитов по показателю MPC (mean platelet component concentration). Для исследования агрегации тромбоцитов взятие крови производили в вакуумные пробирки VACUETTE с 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении крови и раствора цитрата – 9:1. Исследование индуцированной агрегации тромбоцитов проводилось с АДФ в концентрациях 1,25 и 2,5 мкг/мл, коллагеном в концентрации 20 мг/мл и адреналином в концентрациях 1,25 и 2,5 мкг/мл (производитель “Технология стандарт”, Россия). Подготовку анализируемых образцов и приготовление индукторов агрегации проводили согласно инструкции по применению адаптированных наборов реагентов для определения индуцированной агрегации тромбоцитов.

Определение уровня секреции АТФ тромбоцитами производилось в богатой тромбоцитами плазме после добавления индуктора агрегации 5 мкмоль АДФ (набор “CHRONO-LUME”, производитель CHRONO-LOG CORPORATION, USA). Принцип метода состоит в регистрации квантов света, образующихся в результате связывания внеклеточного АТФ с реагентом CHRONO-LUME. Подготовка исследуемых образцов проводилась в соответствии с инструкцией к реагентам.

Для оценки агрегатограмм и секреции тромбоцитами АТФ использовались параметры: максимальная степень агрегации (%) и максимальный уровень высвобождения АТФ (нмоль).

Исследование гранулоцитарности тромбоцитов (mean platelet component concentration, MPC) проводилось на автоматическом гематологическом анализаторе SIEMENS ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA). Взятие крови для данного исследования проводили в вакуумные пробирки VACUETTE K3EDTA, анализ выполнялся через 20 мин после венопункции.

Математическая и статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи пакета лицензионных программ “Microsoft Office 2013”, “Statistica for Windows 12.0, StatSoftInc.”. Нормальность выборки определялась по критерию Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. При сравнении лабораторных данных между группами использовался U-критерий Манна-Уитни (значимыми считались различия при уровне $p < 0,05$). В таблицах данные представлены в формате Me – медиана с указанием 5% и 95% перцентилей.

Результаты. Анализ ТЭГ позволил установить особенности изменений показателей гемостаза у женщин с различными формами гипертензивных расстройств в III триместре беременности. Показатели ТЭГ в изучаемых группах представлены в табл. 1.

Сравнительный анализ полученных данных показал, что время реакции (R) и время достижения фиксированного уровня прочности сгустка (K) было замедлено в группах женщин с гипертензивными расстройствами независимо от нозологической формы по сравнению с контролем ($p < 0,05$ при всех сравнениях). Причем у женщин с тяжелой ПЭ показатели R и K были достоверно увеличены при сравнении с группой умеренной ПЭ ($p_2 = 0,024$ для R и $p_2 = 0,024$ для K) и ХАГ ($p_3 = 0,000$ для R и $p_3 = 0,000$ для K). В группе с ПЭ, развившейся на фоне ХАГ показатели R и K (по медиане) были близки к значениям тех же параметров, наблюдаемым при тяжелой ПЭ, однако, достоверно отличались лишь от группы контроля. Значения угла α были достоверно ниже в группах с ПЭ при сравнении с контролем ($p < 0,05$ при всех сравнениях). При тяжелой ПЭ данный показатель был ниже, чем при умеренной ПЭ ($p_2 = 0,024$) и ХАГ ($p_3 = 0,000$). Время достижения максимальной амплитуды (ТМА) было удлинено в группах с гипертензивными расстройствами при сравнении с контролем ($p < 0,05$ при всех сравнениях) за исключением группы умеренной ПЭ. У женщин с тяжелой ПЭ показатель ТМА был статистически значимо выше в отличие от группы с умеренной ПЭ ($p_2 = 0,025$) и с ХАГ ($p_3 = 0,034$). Суммарный показатель коагуляции (СI) был ниже в группе с тяжелой ПЭ при сравнении с контролем ($p_1 = 0,0032$) и группой ХАГ ($p_3 = 0,038$). При оценке параметра, отражающего активность фибринолиза, сред-

ние значения были наибольшими в группе с тяжелой ПЭ, однако, достоверно отличались лишь от группы женщин с ХАГ ($p_3 = 0,015$).

Для изучения функциональной активности тромбоцитов в исследуемых группах проведено исследование гранулоцитарности тромбоцитов, агрегации тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме с различными концентрациями индукторов агрегации (АДФ, адреналином и коллагеном) и изучение секреции тромбоцитами АТФ в ответ на добавление 5 мкмоль АДФ. Полученные данные представлены в табл. 2.

При анализе полученных результатов агрегатограмм было отмечено снижение агрегационной способности тромбоцитов при добавлении АДФ в дозе 1,25 и 2,5 мкг/мл в группе женщин с тяжелой ПЭ при сравнении с контролем ($p_1 = 0,048$ и $p_1 = 0,007$ соответственно). У женщин с различными формами гипертензивных расстройств степень агрегации тромбоцитов с коллагеном достоверно не отличалась от контроля ($p > 0,05$). Выявлено снижение агрегационной способности тромбоцитов при добавлении адреналина в концентрации 2,5 мкг/мл в группе женщин с тяжелой ПЭ и ПЭ, развившейся на фоне ХАГ, при сравнении с контрольной группой ($p_1 = 0,005$ и $p_1 = 0,011$ соответственно). Индуцированная адреналином агрегация в концентрации 1,25 мкг/мл была ниже при тяжелой ПЭ по сравнению с контролем ($p_1 = 0,004$). При умеренной преэклампсии степень агрегации тромбоцитов, индуцированной адреналином, варьировала в большом диапазоне. При индукции агрегации адреналином в концентрациях 1,25 и 2,5 мкг/мл у 9 женщин наблюдалось выраженное снижение агрегационной способности тромбоцитов (менее 10%), а высокие показатели агрегации (выше 80%) – у 4 женщин. Несмотря на низкие значения медианы максимальной

Таблица 1

Показатели тромбозластографии у женщин с различными формами гипертензивных расстройств в III триместре беременности.

Показатели	Контроль $n = 47$	Умеренная ПЭ $n = 22$	Тяжелая ПЭ $n = 31$	ХАГ $n = 45$	ПЭ на фоне ХАГ $n = 20$
R, мин	5,2 (2,3–11,7)	8 (3–16,7) $p_1 = 0,013$	11,1 (6,2–8,2) $p_1 = 0,000$ $p_2 = 0,024$	6,9 (2,3–15,1) $p_1 = 0,031$ $p_3 = 0,000$	10,85 (2,4–19,8) $p_1 = 0,007$
K, мин	1,3 (0,8–4,2)	2,2 (0,8–6,7) $p_1 = 0,048$	3,4 (1,4–6,4) $p_1 = 0,000$ $p_2 = 0,024$	1,95 (1,1–4,6) $p_1 = 0,037$ $p_3 = 0,000$	3,15 (1,1–7,2) $p_1 = 0,038$
α , °	71,5 (50,7–80,6)	61,9 (38,9–76,8) $p_1 = 0,039$	49,7 (35,4–69,1) $p_1 = 0,000$ $p_2 = 0,013$	65,95 (46,5–75) $p_3 = 0,000$	55,75 (31,8–76,5) $p_1 = 0,015$
МА, мм	64,6 (53–72,5)	48,6 (48,6–75,9)	63,6 (52,2–74,6)	65,1 (53,1–77,7)	67,65 (53,6–76,2)
ТМА, мин	21 (10,4–37)	25,2 (9,8–39,2)	31,9 (18,2–49,4) $p_1 = 0,001$ $p_2 = 0,025$	25,6 (16,8–46,7) $p_1 = 0,017$ $p_3 = 0,034$	32,9 (14,8–54,7) $p_1 = 0,005$
G, d/sc	9,1 (5,6–13,2)	8,45 (4,7–15,8)	8,7 (5,5–14,7)	9,35 (5,7–17,4)	10,45 (5,8–16)
E, d/sc	182,5 (112,8–264,3)	169,4 (94,6–315,7)	174,5 (109,4–293,1)	186,4 (113,4–349)	209,4 (115,6–319,8)
CI	2,7 (0,7–4,2)	1,35 (0,3–4,1)	1,7 (-0,5–3,6) $p_1 = 0,0032$	2,45 (-0,2–4,8) $p_3 = 0,038$	2,35 (-1,9–4)
LY30, %	0,9 (0–18)	1 (0–19,5)	5,6 (0–26,5)	1,15 (0–10) $p_3 = 0,015$	0,55 (0–13,1)

Примечание. Здесь и в табл. 2: p_1 – уровень значимости различий при сравнении с контролем; p_2 – уровень значимости различий при сравнении с умеренной ПЭ; p_3 – уровень значимости различий при сравнении с тяжелой ПЭ; p_4 – уровень значимости различий при сравнении с ХАГ.

амплитуды агрегации при умеренной ПЭ достоверных отличий от других групп выявлено не было. При оценке секреции АТФ тромбоцитами активированными АДФ было выявлено восьмикратное снижение показателя в группе с тяжелой ПЭ при сравнении с контролем ($p_1 = 0,028$). Уровень гранулоцитарности тромбоцитов был выше при всех видах гипертензивных расстройств ($p < 0,05$) за исключением группы женщин с умеренной ПЭ ($p > 0,05$) при сравнении с контрольной группой.

Обсуждение. В течение беременности у женщин происходит постепенное повышение коагуляционного потенциала крови, что необходимо для минимизации кровопотери в родах. Максимально выраженные изменения в системе гемостаза отмечаются в III триместре беременности [23]. Адекватная оценка свертывающей системы крови у беременных с сопутствующей патологией возможна лишь при сравнении с показателями нормально протекающей беременности.

Многокомпонентная система гемостаза имеет сложные механизмы регуляции, поэтому, при клинической оценке системы гемостаза используют глобальные тесты, такие как тромбоэластография (ТЭГ). Изменения параметров ТЭГ демонстрируют замедление фазы инициации коагуляции (увеличение показателя R) во всех группах женщин с артериальной гипертензией, причем наиболее выраженные изменения (в 2 раза) отмечены в группах с тяжелой ПЭ и ПЭ на фоне ХАГ. Данные изменения показателя R могут свидетельствовать о смещении гемостатического равновесия в сторону гипокоагуляции, что может быть вызвано снижением активности факторов свертывания, либо о повышении уровней продуктов паракоагуляции. Аналогичные сдвиги отмечены и в скорости образования тромбина (K). Параметр K характеризует начальную скорость образования сгустка и в большей степени зависит от плазменных компонентов гемостаза. Полученные изменения показателя

R и K указывают на пролонгирование фаз инициации и усиления свертывания крови у женщин с различными формами гипертензивных расстройств в III триместре беременности и характеризуют гипокоагуляционные изменения плазменного звена гемостаза. Удлинение времени достижения максимальной амплитуды (ТМА) в группах с гипертензивными расстройствами (за исключением группы с умеренной ПЭ) указывает на гипокоагуляционные сдвиги, которые обусловлены особенностями функционального состояния тромбоцитов и процессов полимеризации фибрина.

Угол α – показатель, позволяющий оценить скорость образования тромба и рост фибриновой сети в пространстве. Значение этого параметра зависит от количества и функциональной активности тромбоцитов, концентрации фибриногена и в меньшей степени от плазменных факторов свертывания крови. Снижение данного показателя у женщин с ПЭ различной степени тяжести и ПЭ, развившейся на фоне ХАГ, говорит об угнетении свертывания крови и замедлении процесса фибринообразования.

Согласно литературным данным, максимальная прочность сгустка (МА) в большей степени характеризует функцию тромбоцитов и в меньшей зависит от количества фибриногена [24]. Интересно отметить, что в данном исследовании, несмотря на снижение активности тромбоцитарного звена гемостаза у женщин с тяжелой ПЭ и ПЭ, развившейся на фоне ХАГ показатель МА не имел тенденции к снижению. Вероятно, максимальная прочность сгустка при беременности сохраняется на достаточном уровне благодаря высоким концентрациям фибриногена в III триместре беременности.

Прочность (G) и эластичность (E) сгустка – параметры, отражающие процессы полимеризации фибрина и зависят от активности XIII фактора свертывания крови (фибринстабилизирующий фактор).

Таблица 2

Показатели агрегации, секреции и гранулоцитарности, тромбоцитов у женщин с различными формами гипертензивных расстройств в III триместре беременности.

Показатели	Контроль, $n = 47$	Умеренная ПЭ, $n = 22$	Тяжелая ПЭ, $n = 31$	ХАГ, $n = 45$	ПЭ на фоне ХАГ, $n = 20$
Максимальная амплитуда, % АДФ 1,25 мкг/мл	53 (23–94)	25 (11–87)	31 (15–83) $p_1 = 0,048$	31 (13–81)	36,5 (17–84)
Максимальная амплитуда, % АДФ 2,5 мкг/мл	76 (40–94)	66 (21–94)	52 (27–86) $p_1 = 0,007$	74 (41–87) $p_3 = 0,031$	65 (30–88)
Максимальная амплитуда, % Коллаген 20 мг/мл	83 (72–92)	78 (18–100)	84 (7–93)	78,5 (66–94)	82,5 (25–97)
Максимальная амплитуда, % Адреналин 1,25 мкг/мл	78,2 (62,9–94,4)	15,2 (3,8–108,2)	30,9 (9,6–109,4) $p_1 = 0,004$	80,1 (2,5–104,9)	26,8 (10,3–93,6)
Максимальная амплитуда, % Адреналин 2,5 мкг/мл	89,4 (62,5–113,5)	19,6 (4,4–92,3)	24,1 (5,2–97,8) $p_1 = 0,005$	79,2 (15,8–108,2) $p_3 = 0,009$	50,5 (5,3–58,9) $p_1 = 0,011$
Секреция тромбоцитами АТФ, нмоль	1,63 (0,55–2,19)	1,45 (0,12–2,06)	0,2 (0–2,07) $p_1 = 0,028$	1,2 (0–4,76)	0,85 (0–1,7)
MPC, г/dL	24,9 (21,7 – 27,4)	25,5 (22,4 – 28,1)	26,3 (23,1 – 28,4) $p_1 = 0,006$	25,9 (23,7 – 27,7) $p_1 = 0,014$	26,9 (24,2 – 29,5) $p_1 = 0,000$ $p_2 = 0,021$ $p_4 = 0,009$

Параметры МА, G и E отражают конечный результат образования тромба. Учитывая отсутствие изменений данных показателей на фоне снижения коагуляционного потенциала плазменного звена гемостаза в исследуемых группах беременных можно предположить достаточную активность тромбоцитарного звена при беременности. Вероятно, такой уровень МА обеспечивается за счет высокой концентрации фибриногена при беременности.

Основной интегральный показатель ТЭГ – индекс коагуляции (CI) был снижен у женщин с тяжелой ПЭ и оставался неизменным в других группах при сравнении с контролем, что обусловлено увеличением показателей R, K и угла α . Было так же выявлено достоверное отличие данного показателя между группами ХАГ и тяжелой ПЭ, что, возможно, будет полезно для дифференциальной диагностики этих состояний в практическом акушерстве. На сегодняшний день необходимым критерием для постановки диагноза преэклампсии является наличие протеинурии, однако, исследования последних лет продемонстрировали низкую диагностическую ценность данного показателя, что диктует необходимость поиска других критериев диагностики ПЭ [25].

Интенсивность лизиса сгустка оставалась неизменной при всех видах гипертензивных расстройств и характеризовалась большим разбросом показателей.

По результатам ТЭГ можно сделать вывод об относительном снижении активности плазменно-коагуляционного звена гемостаза с сохранением нормальной работы тромбоцитарного звена, причем максимальные изменения отмечены у женщин с тяжелой ПЭ и ПЭ, развившейся на фоне ХАГ. Однако, для установления точной причины этих изменений необходимо количественное исследование уровней прокагулянтов, антикоагулянтов и исследование качественных характеристик тромбоцитов.

На сегодняшний день немало работ посвящено изучению функциональной активности тромбоцитов у женщин, имеющих повышенное артериальное давление при беременности [26, 27]. Однако, сравнить полученные в них результаты довольно сложно по причине различного дизайна исследований, использования разных концентраций и видов индукторов агрегации.

В ряде научных трудов последних лет приводятся различные данные об изменении индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов при ПЭ [28–30]. В данном исследовании агрегация тромбоцитов с коллагеном была неизменной в исследуемых группах. Возможно, отсутствие различий связано с тем, что при беременности, осложненной преэклампсией, снижается чувствительность тромбоцитов к стимулирующим агентам [31]. Немногочисленны данные об агрегации тромбоцитов с коллагеном у женщин с ХАГ и ПЭ, развившейся на фоне ХАГ в III триместре беременности. По данным В.С.Чулкова и соавт. [32,33] у женщин с ХАГ агрегация, индуцированная коллагеном остается неизменной в III триместре беременности. Коллаген, в отличие от АДФ и адреналина, является сильным индуктором агрегации тромбоцитов и, по всей видимости, способен вызывать агре-

гацию даже у десенсибилизированных тромбоцитов. Однако, данный вопрос остается дискуссионным и требует более детального изучения.

Показатели агрегации тромбоцитов при использовании АДФ в концентрациях 1,25 и 2,5 мкг/мл показали свою диагностическую значимость: выявлено снижение показателя максимального уровня агрегации у женщин с тяжелой ПЭ, что говорит о снижении функциональной активности тромбоцитов у данного контингента женщин. Схожие изменения индуцированной агрегации тромбоцитов были получены при добавлении 1,25 и 2,5 мкг/мл адреналина в группе женщин с тяжелой ПЭ, а при добавлении 2,5 мкг/мл адреналина отмечено снижение у женщин с ПЭ, возникшей на фоне ХАГ. Установлено, что при ПЭ имеет место увеличение в крови веществ, оказывающих стимулирующее влияние на тромбоциты [34], а также уменьшение количества наиболее функционально активных тромбоцитов, что в свою очередь приводит к уменьшению агрегационного потенциала крови [35]. Снижение агрегационных свойств тромбоцитов при добавлении АДФ и адреналина может быть обусловлено состоянием рецепторного аппарата (P2 рецепторы к АДФ и $\alpha 2$ -адренорецепторов) и/или нарушениями в системе сигнальных путей тромбоцитов [36]. Еще одной причиной снижения агрегации тромбоцитов при ПЭ может быть нарушение процессов, регулирующих внутриклеточное содержание цАМФ, цГМФ и простагландинов [37].

У женщин с ХАГ уровень индуцированной агрегации тромбоцитов с АДФ и адреналином в дозе 2,5 мкг/мл оставался высоким (достоверно не отличался от контроля) и был достоверно выше уровня агрегации при тяжелой ПЭ, что может быть полезно для дифференциальной диагностики этих форм гипертензивных расстройств. Уровень агрегационной активности тромбоцитов в данном случае, вероятно обусловлен различными патогенетическими механизмами и длительностью существования артериальной гипертензии.

Важно отметить, что исследование только уровня максимальной амплитуды агрегации тромбоцитов не всегда достаточно для получения ответов на все вопросы, касающихся изменений функциональных свойств тромбоцитов. Для более точного представления о процессах активации тромбоцитов необходимо исследование и других показателей агрегатограмм: времени достижения максимальной амплитуды, длительности Lag-фазы, скорости агрегации и характера кривой агрегации (одноволновой или двуволновой вид кривой) [36].

Секреция АТФ тромбоцитами, активированными АДФ, отражающая реакцию высвобождения плотных гранул и первичную агрегацию была многократно снижена при тяжелой ПЭ (в 8 раз), а при других формах гипертензивных расстройств оставалась неизменной по сравнению с контролем. Сниженная секреторная способность тромбоцитов может быть вызвана нарушением процесса дегрануляции или повышением количества тромбоцитов со сниженной функциональной активностью при ПЭ [37].

При исследовании гранулоцитарности – параметра, характеризующего насыщенность тромбоцитов

гранулами выявлена обратная корреляционная связь с уровнем секреции тромбоцитами АТФ ($r = -0,82$), что подтверждает нарушение процессов дегрануляции тромбоцитов у женщин с тяжелой ПЭ.

На сегодняшний день нет единого мнения об изменениях в свертывающей системе крови у женщин с ПЭ. В ряде исследований отмечен рост коагуляционного потенциала [38, 39], в других напротив – снижение [19, 20], что находит отражение в клинической картине: повышенной частоте встречаемости осложнений, как кровотечений, так и тромбозов и тромбоэмболий [17–19, 37, 40].

Наблюдаемое относительное гипокоагуляционное состояние укладывается в лабораторную картину подострого или хронического ДВС-синдрома. В данном исследовании получены данные, свидетельствующие о формировании относительного гипокоагуляционного состояния у женщин с гипертензивными расстройствами, особенно при тяжелой ПЭ и ПЭ, развившейся на фоне ХАГ, что в свою очередь необходимо рассматривать как повышение риска развития кровотечения в послеродовом периоде.

Таким образом, использование в клинической практике метода тромбоэластографии, агрегации тромбоцитов с низкими концентрациями АДФ и адреналина и расширенной тромбоцитограммы позволяет комплексно оценить состояние системы гемостаза и определить характер нарушений процессов гемокоагуляции у беременных женщин с различными формами гипертензивных расстройств в III триместре.

Выводы. 1. Исследование функции тромбоцитов у женщин с гипертензивными расстройствами в III триместре беременности целесообразно выполнять с индукторами агрегации АДФ и адреналина в концентрации 1,25 и 2,5 мкг/мл с учетом характеристики секреции АТФ и определения уровня гранулоцитарности тромбоцитов по параметру средней концентрации компонентов тромбоцитов (MPC).

2. Использование тромбоэластографии в цельной крови при беременности актуально, поскольку позволяет комплексно оценить плазменное и тромбоцитарное звенья гемостаза с учетом вклада других форменных элементов крови в состояние системы гемостаза.

3. Использование таких параметров ТЭГ как R, K, угол α , TMA, CI, LY30 может быть полезно для дифференциальной диагностики хронической артериальной гипертензии и тяжелой преэклампсии.

4. У женщин с умеренной преэклампсией и хронической артериальной гипертензией в III триместре беременности выявлено снижение активности плазменного звена гемостаза при сохранении функциональной активности тромбоцитов.

5. У женщин с тяжелой преэклампсией в III триместре беременности отмечается выраженное снижение активности плазменного и тромбоцитарного звена гемостаза с нарушением процесса дегрануляции плотных гранул активированных тромбоцитов.

6. У женщин с преэклампсией, возникшей на фоне хронической артериальной гипертензии в III триместре беременности выявлено выраженное снижение

активности плазменного звена гемостаза и снижение агрегационной способности тромбоцитов при индукции низкими концентрациями адреналина.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 6-9, 11, 12, 14-17, 19, 21, 24-27, 29-31, 34, 38-40 см. REFERENCES)

- Абдрахманова А.И., Амиров Н.Б., Цибулькин Н.А., Гайфуллина Р.Ф. Артериальная гипертензия при беременности в клинике внутренних болезней. *Вестник современной клинической медицины.* 2018; 11(3): 51-9.
- Стрюк Р.И., Бернс С.А., Филиппова М.П., Брыткова Я.В., Борисов И.В., Баркова Е.Л. и др. Сердечно-сосудистые заболевания и ассоциированные с ними коморбидные состояния как факторы, определяющие неблагоприятные перинатальные исходы при беременности – анализ результатов регистра беременных «БЕРЕГ». *Терапевтический архив.* 2018; 90(1): 9-16.
- Панова И.А., Рокотьянская Е.А., Кузьменко Г.Н., Кудряшова А.В., Попова И.Г., Сытова Л.А. и др. Маркеры воспалительной реакции и дисфункции эндотелия у беременных с гипертензивными расстройствами различного генеза. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 10: 692-6.
- Горшунова Н. К., Медведев Н.В. Сопряженность гипертензивной эндотелиальной дисфункции с выраженностью миокардиальных поражений и хронической сердечной недостаточности у больных старшего возраста. *Артериальная гипертензия.* 2017; 2: 112-21.
- Клецова М.И., Чурилов А.В., Свиридова В.В., Джеломанова С.А., Носкова О.В. Анализ причин и частоты возникновения акушерских кровотечений на Донбассе. *Вестник гигиены и эпидемиологии.* 2019; 23(3): 233-5.
- Столяров Г.С., Минаева О.В., Фоминова Г.В., Тюрина Е.П., Амри М.С., Косенко Ю.Ю. и др. Особенности состояния центральной гемодинамики и гемостаза у беременных с преэклампсией. *Современные проблемы науки и образования.* 2018; 3: 73.
- Шифман Е.М., Баринов С.В., Долгих В.Т., Месянникова И.В., Блауман С.И. Профилактика акушерских осложнений, ассоциированных с полиморфизмами генов тромбофилии. *Гематология и трансфузиология.* 2015; 60(1): 24-8.
- Момот А.П., Николаева М.Г., Сердюк Г.В., Елыкомов В.А., Мамаев А.Н., Романов В.В. и др. Оценка состояния системы гемостаза при физиологически протекающей беременности (методические рекомендации). *Российский вестник акушера-гинеколога.* 2018; 18(3-2): 2-37.
- Сюндюкова Е.Г., Медведев Б.И., Сашенков С.Л., Зайнетдинова Л.Ф., Яковлева Ю.А., Тарасова Л.Б. и др. Показатели системы гемостаза и маркеры системного воспаления у беременных с преэклампсией. *Человек. Спорт. Медицина.* 2014; 14(1): 88-95.
- Вереина Н.К., Чулков В.С. Состояние гемостаза у женщин с хронической артериальной гипертензией в различные trimestры беременности. *Региональное кровообращение и микроциркуляция.* 2011; 10(4):28-33.
- Сумеркина В.А., Чулков В.С., Чулков Вл.С., Головнева Е.С., Телешева Л.Ф., Мезенцева Е.А. и др. Оценка состояния системы гемостаза, показателей углеводного и липидного обмена у молодых женщин с абдоминальным ожирением и артериальной гипертензией. *Ожирение и метаболизм.* 2015; 12(4): 29-33.
- Ящук А.Г., Масленников А.В., Даутова Л.А., Галимов Ш.Н., Гурова З.Г., Валиева Л.К. Роль тромбоцитов в реализации репродуктивной функции у женщин. *Российский вестник акушера-гинеколога.* 2017; 17(4): 20-4.
- Васильев С.А., Берковский А.Л., Мелкумян А.Л., Суворов А.В., Мазуров А.В., Козлов А.А. *Клинико-лабораторная диагностика нарушений функций тромбоцитов.* Москва: Принт; 2013.
- Бакунович А. В., Буланова К. Я. Структурные и функциональные перестройки тромбоцитов при преэклампсии беременных. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология.* 2018; 4: 76-83.

REFERENCES

1. The global strategy for women's, children's and adolescents' health (2016-2030). WHO. 2015. 105 p. http://globalstrategy.everywomaneverychild.org/pdf/EWEC_globalstrategyreport_200915_FINAL_WEB.pdf. (accessed 5 February 2020).
2. Gasse C., Boutin A., Demers S., Chaillet N., Bujold E. Body mass index and the risk of hypertensive disorders of pregnancy: the great obstetrical syndromes (GOS) study. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2019; 32(7): 1063-8.
3. Cristina Q., Aline S., Wolneyde M., Evandro M. Left ventricular remodeling and diastolic function in chronic hypertensive pregnant women. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. 2015; 5(2): 187-92.
4. Abdrakhmanova A.I., Amirov N.B., Tsibul'kin N.A., Gayfullina R.F. Arterial hypertension during pregnancy in the clinic of internal diseases. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2018; 11(3): 51-9. (in Russian)
5. Stryuk R.I., Berns S.A., Filippova M.P., Brytkova Ya.V., Borisov I.V., Barkova E.L. et al. Cardiovascular disease and associated comorbid conditions as determinants of adverse perinatal outcomes in pregnancy-an analysis of the results of the register of pregnant BEREГ. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2018; 90(1): 9-16. (in Russian)
6. Wu P., Haththotuwa R., Kwok C., Babu A., Kotronias R., Rushton C. et al. Preeclampsia and future cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis. *Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes*. 2017; 10(2): e003497.
7. Quitete C., Salvany A., Martins W., Mesquita E. Left ventricular remodeling and diastolic function in chronic hypertensive pregnant women. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. 2015; 5(2): 187-92.
8. Bartsch E., Medcalf K., Park A., Ray J. Clinical risk factors for preeclampsia determined in early pregnancy: systematic review and meta-analysis of large cohort studies. *BMJ*. 2016; 353: i1753.
9. Story L., Chappell L. Preterm pre-eclampsia: What every neonatologist should know. *Early human development*. 2017; 114: 26-30.
10. Panova I.A., Rokotyanskaya E.A., Kuz'menko G.N., Kudryashova A.V., Popova I.G., Sytova L.A. et al. Markers of the inflammatory reaction and endothelial dysfunction in pregnant women with hypertensive disorders of various origins. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 10: 692-6. (in Russian)
11. Boeldt D., Bird I. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia. *The Journal of endocrinology*. 2017; 232(1): R27.
12. Myatt L., Roberts J. Preeclampsia: syndrome or disease?. *Current hypertension reports*. 2015; 17(11): 83.
13. Gorshunova N. K., Medvedev N.V. The combination of hypertensive endothelial dysfunction with the severity of myocardial lesions and chronic heart failure in older patients. *Arterial'naya gipertenziya*. 2017; 2: 112-21. (in Russian)
14. Konukoglu D., Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Hypertension: from basic research to clinical practice*. 2016; 956: 511-40.
15. Gilani S., Weissgerber T., Garovic V., Jayachandran M. Preeclampsia and extracellular vesicles. *Current hypertension reports*. 2016; 18(9): 68.
16. Kenny L.C., Mccrae K.R., Cunningham F.G. Platelets, coagulation, and the liver. In: N.T. Robert, M.R. James, F.G. Cunningham, M.D. Lindheimer (Eds.), *Hypertensive Disorders in Pregnancy*. 4th Ed. Academic Press. 2015: 379-96.
17. Haram K., Mortensen J., Mastrolia S., Erez F. Disseminated intravascular coagulation in the HELLP syndrome: how much do we really know?. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2017; 30(7): 779-88.
18. Kletsova M.I., Churilov A.V., Sviridova V.V., Dzhelomanova S.A., Noskova O.V. Analysis of the causes and incidence of postpartum haemorrhage in the Donbass. *Vestnik gigieny i epidemiologii*. 2019; 23(3): 233-5. (in Russian)
19. Egan K., Connor H., Kevane B., Malone F., Lennon A., Zadjali A. et al. Elevated plasma TFPI activity causes attenuated TF-dependent thrombin generation in early onset preeclampsia. *Thrombosis and haemostasis*. 2017; 117(8): 1549-57.
20. Stolyarov G.S., Minaeva O.V., Fominova G.V., Tyurina E.P., Amri M.S., Kosenko Yu.Yu. et al. Features of the state of central hemodynamics and hemostasis in pregnant women with preeclampsia. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2018; 3: 73. (in Russian)
21. Othman M., Han K., Elbatarny M., Kadir R. The use of viscoelastic hemostatic tests in pregnancy and puerperium: review of the current evidence-communication from the Women's Health SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2019; 17(7): 1184-9.
22. Shifman E.M., Barinov S.V., Dolgikh V.T., Medyanikova I.V., Blauman S.I. Prevention of obstetric complications associated with thrombophilia gene polymorphisms. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2015; 60(1): 24-8. (in Russian)
23. Momot A.P., Nikolaeva M.G., Serdyuk G.V., Elykomov V.A., Mamaev A.N., Romanov V.V. et al. Assessment of the state of the hemostatic system in physiologically occurring pregnancy (guidelines). *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2018; 18(3-2): 2-37. (in Russian)
24. TEG Analytical Software Version 4.2.3. User manual. Copyright © 1999-2007 Haemoscope Corp. P. 5-6. <http://studylib.net/doc/18643089/pn06-510-teg-5000-user-manual> (accessed 20 February 2020).
25. Sanders C., Hess P. Updates in Preeclampsia. *Current Anesthesiology Reports*. 2015; 5(1): 74-81.
26. Leal C., Leal D., Adefegha S., Morsch V., Silva J., Rezer J. et al. Platelet aggregation and serum adenosine deaminase (ADA) activity in pregnancy associated with diabetes, hypertension and HIV. *Cell biochemistry and function*. 2016; 34(5): 343-50.
27. Tuudah D., Hussein B., Riddell A., Gomez K., Kadir R. P045: The changes in platelet function during the three trimesters of uncomplicated pregnancy and puerperium compared to non-pregnant controls. *Thrombosis Research*. 2019; 175: 21.
28. Syundyukova E.G., Medvedev B.I., Sashenkov S.L., Zaynetdinova L.F., Yakovleva Yu.A., Tarasova L.B., Hemostasis et al. System indices and systemic inflammation markers in pregnant women with preeclampsia. *Chelovek. Sport. Meditsina*. 2014; 14(1): 88-95. (in Russian)
29. Gungor Z., Ekmekci H., Tuten A., Toprak S., Ayaz G., Caliskan O. et al. Is there any relationship between adipocytokines and angiogenesis factors to address endothelial dysfunction and platelet aggregation in untreated patients with preeclampsia?. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2017; 296(3): 495-502.
30. Sahin S., Ozakpinar O., Eroglu M., Tulunay A., Ciraci E., Uras F. et al. The impact of platelet functions and inflammatory status on the severity of preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2015; 28(6): 643-8.
31. Burke N., Flood K., Muellers S., Murray A., Dunne E., Cotter B. et al. Reduced spontaneous platelet aggregation: a novel risk factor for adverse pregnancy outcome. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2016; 199: 132-6.
32. Vereina N.K., Chulkov V.S. Haemostatic state in women with chronic hypertension in different trimesters of pregnancy. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2011; 10(4): 28-33. (in Russian)
33. Sumerkina V.A., Chulkov V.S., Chulkov V.I.S., Golovneva E.S., Telesheva L.F., Mezentseva E.A. et al. Evaluation of the hemostatic state, carbohydrate and lipid metabolism in young women with abdominal obesity and hypertension. *Ozhirenie i metabolism*. 2015; 12(4): 29-33. (in Russian)
34. Gouloupoulou S., Davidge S. Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia. *Trends in molecular medicine*. 2015; 21(2): 88-97.
35. Yashchuk A.G., Maslennikov A.V., Dautova L.A., Galimov Sh.N., Gurova Z.G., Valieva L.K. The role of platelets in female reproductive function. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2017; 17(4): 20-4. (in Russian)
36. Vasil'ev S.A., Berkovskiy A.L., Melkumyan A.L., Suvorov A.V., Mazurov A.V., Kozlov A.A. *Clinical and laboratory diagnosis of platelet dysfunction*. Moscow: Print; 2013. (in Russian)
37. Bakunovich A. V., Bulanova K. Ya. Structural and functional alterations of platelets in pregnant women with preeclampsia. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekologiya*. 2018; 4: 76-83. (in Russian)
38. Chen Y., Lin L. Potential value of coagulation parameters for suggesting preeclampsia during the third trimester of pregnancy. *The American journal of the medical sciences*. 2017; 354(1): 39-43.
39. Craici L., Wagner S., Weissgerber T., Grande J., Garovic V. Advances in the pathophysiology of pre-eclampsia and related podocyte injury. *Kidney international*. 2014; 86(2): 275-85.
40. Schwartz D. A. Hypertensive Mothers, Obstetric Hemorrhage, and Infections: Biomedical Aspects of Maternal Death Among Indigenous Women in Mexico and Central America. In: D.A. Schwartz. Maternal Death and Pregnancy-Related Morbidity Among Indigenous Women of Mexico and Central America. *Global Maternal and Child Health (Medical, Anthropological, and Public Health Perspectives)*. Springer, Cham. 2018; 35-50.

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Королёва-Ушакова А.Г., Баранова Е.В., Игнатов С.Г., Федюкина Г.Н., Соловьёв П.В., Коломбет Л.В., Бикетов С.Ф.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЛИКОКОНЬЮГАТОВ В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТОВ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ УСКОРЕННОЙ СЕРОДИАГНОСТИКИ ЛЕПРЫ

ФБУН ГНЦ ПМБ «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора; 142279, п. Оболенск, Московская обл., Серпуховский район, Россия

Были синтезированы гликоконъюгаты с БСА (бычьим сывороточным альбумином) с использованием следующих углеводов: дисахаридного фрагмента *M.leprae* ФГЛ-1 (фенольного гликолипида-1); комплекса дисахаридного фрагмента ФГЛ-1 и разветвлённого гексасахаридного фрагмента ЛАМ (липоарабиноманна *M.tuberculosis*); диарабинофуранозного фрагмента ЛАМ. Гликоконъюгаты использовали в качестве антигенных компонентов для конструирования серологических экспресс-тестов в иммунохроматографическом формате (ИХ-тестов). Результаты анализа сывороток больных лепрой, контактных по лепре лиц и здоровых доноров указывают на то, что наиболее перспективным антигенным компонентом является конъюгат БСА с двумя синтетическими эпитопами - дисахаридным производным ФГЛ-1 и разветвлённым гексасахаридным фрагментом ЛАМ. Этот конъюгат обеспечил наилучшую диагностическую чувствительность ИХ-тестов при основных формах лепры - малоациллярной (PB) и мультиациллярной (MB).

Ключевые слова: *Mycobacterium leprae*; лепра; гликоконъюгаты; иммунохроматографический анализ; серодиагностика.

Для цитирования: Королёва-Ушакова А.Г., Баранова Е.В., Игнатов С.Г., Федюкина Г.Н., Соловьёв П.В., Коломбет Л.В., Бикетов С.Ф. Использование синтетических гликоконъюгатов в качестве компонентов иммунохроматографических тестов для ускоренной серодиагностики лепры. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 289-293. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-289-293>

Korolyova-Ushakova A.G., Baranova E.V., Ignatov S.G., Fedyukina G.N., Solov'ev P.V., Kolombet L.V., Biketov S.F.

THE USE OF SYNTHETIC GLYCOCONJUGATES AS COMPONENTS OF THE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST FOR RAPID SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF LEPROSY

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russia

*The glycoconjugates with BSA (bovine serum albumin) were synthesized using a next saccharide: disaccharide derivative *M.leprae* PGL-1 (phenolic glycolipid-1); a complex of the disaccharide fragment and the branched hexasaccharide fragment LAM (lipoarabinomannan); diaraabinofuranose fragment LAM. These glycoconjugates were used as antigenic components for leprosy rapid serotest construction in immunochromatographic format (leprosy LF serotest). The data obtained with sera of leprosy patients, patients who have been in contact with leprosy, and healthy donors indicate that the most promising antigenic component is a BSA conjugate with two synthetic epitopes - a disaccharide derivative of PGL-1 and a branched hexasaccharide fragment of LAM. The leprosy LF serotest with such glycoconjugate demonstrated the greatest diagnostic sensitivity for main forms of leprosy - paucibacillary (PB) and multibacillary (MB).*

Key words: *Mycobacterium leprae*; leprosy; glycoconjugates; LF tests, serodiagnosis.

For citation: *Korolyova-Ushakova A.G., Baranova E.V., Ignatov S.G., Fedyukina G.N., Solov'ev P.V., Kolombet L.V., Biketov S.F. The use of synthetic glycoconjugates as components of the immunochromatographic test for rapid serological diagnosis of leprosy. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (5): 289-293. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-289-293>*

For correspondence: *Korolyova-Ushakova A.G.*, junior researcher of the department of immunobiochemistry of pathogen microorganisms; e-mail: korolyovaushakova@mail.ru

Information about authors:

Королёва-Ушакова А.Г., <https://orcid.org/0000-0002-0851-9902>

Баранова Е.В., <https://orcid.org/0000-0002-6455-5756>

Игнатов С.Г., <https://orcid.org/0000-0003-1755>

Федюкина Г.Н., <https://orcid.org/0000-0002-7737>

Соловьёв П.В., <https://orcid.org/0000-0001-7355-8396>

Бикетов С.Ф., <https://orcid.org/0000-0003-1179-6895>

Коломбет Л.В., <https://orcid.org/6602368837>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 28.01.2020
Accepted 14.02.2020

Для корреспонденции: *Гильмиярова Фрида Насыровна*, заслуженный деятель науки РФ, д-р мед.наук, проф. каф. фундаментальной и клин. биохимии с лабораторной диагностикой; e-mail: bio-sam@yandex.ru

Введение. Лепра (проказа, болезнь Хансена) — хроническое инфекционное заболевание из группы микобактериозов, вызываемое *M. leprae*, характеризующееся поражением производных эктодермы — кожных покровов, слизистых оболочек и периферической нервной системы; продолжительным инкубационным периодом, рецидивирующим течением, нередко приводящим к инвалидизации.

По официальным данным ВОЗ число зарегистрированных случаев заболевания лепрой в 2018 г. составило 211 009. Несмотря на мировую тенденцию к снижению заболеваемости лепрой, в эпидемических очагах продолжают выявляться новые случаи лепры. Заболевание относится к эндемичным в 53 странах мира, преимущественно в странах с жарким и влажным климатом (Юго-Восточная Азия, Африка, Южная и Центральная Америка), где проживает почти 2 млрд. людей. В настоящее время основное количество заболевших (всего в мире около 200 тыс. в год) приходится на страны Юго-Восточной Азии (Индия — 120 тыс. случаев в год), Латинской Америки и Африки. На территории России эндемичными очагами по лепре считаются дельта Волги и Северный Кавказ, продолжают выявляться новые случаи заболеваемости и в странах ближнего зарубежья (Казахстан и Узбекистан), которые носят устойчивый спорадический характер [1].

Классификации форм лепры, которых было предложено несколько, базируются на клинических, бактериологических, иммунологических и гистологических критериях этого сложного заболевания. Наиболее часто используют классификацию, предложенную ВОЗ, и ориентированную на лечебные цели. В ее основе лежит деление лепры на две формы: малобациллярную (РВ) и мультибациллярную (МВ). Пациенты с первой формой имеют от одного до пяти поражений на коже, а пациенты со второй формой — шесть и более поражений.

Основными лабораторными методами диагностики лепры являются бактериоскопическое исследование, патогистологическое исследование кожи, взятой из края очага поражения, лепроминовая проба (проба Митсуды), постановка функциональных проб в очагах кожных поражений. Однако данные методы имеют ряд недостатков, включая очень низкую чувствительность, и не всегда позволяют подтвердить диагноз лепры на ранних стадиях заболевания. Этим недостатком лишён метод ПЦР (полимеразная цепная реакция), который чрезвычайно чувствителен и специфичен, но он требует оборудованной лаборатории и подготовленного персонала, что не всегда выполнимо в развивающихся странах [1, 2].

В связи с этим внимание медиков было обращено на серодиагностику лепры, которая может осуществляться в условиях недостаточного медицинского обеспечения. Показано, что при лепре антительный иммунный ответ в основном направлен на родо- и видоспецифические антигены, такие как ЛАМ (липоарабиноманнан) и ФГЛ-1 (фенольный гликолипид-1) [3, 4]. Целые молекулы этих антигенов дороги в получении и склонны к неспецифическому

взаимодействию, поэтому в серологии используют отдельные эпитопы, которые частично или полностью синтезируют химически. Для иммунореактивности синтетические углеводные эпитопы необходимо конъюгировать с белковым носителем, в роли которых наиболее часто используют бычий или человеческий альбумины. В серодиагностике лепры методом иммуноферментного анализа (ИФА) достаточно давно используют конъюгаты полусинтетического или синтетического аналогов специфического углеводного эпитопа из ФГЛ-1 *M. leprae* с бычьим сывороточным альбумином [5]. Недостатком подобных тест-систем, использующих в качестве антигена аналог углеводного эпитопа из ФГЛ-1, является выявление антител лишь к одному эпитопу, в то время как антительный ответ при лепре направлен против нескольких антигенов. Поэтому для серодиагностики различных форм лепры используют разные микобактериальные антигены, в частности, ФГЛ-1, ND-O-BSA, LID-1 [6]. Также были предприняты попытки объединения нескольких эпитопов путем генетического слияния рекомбинантных лепрозных белковых антигенов. Однако в целом экспериментальные ИФА тест-системы на основе белковых антигенов уступают по чувствительности тестам на основе углеводных эпитопов [7].

Следует отметить, что, как и ПЦР, ИФА требует использования специального оборудования, расходных материалов и высококвалифицированного персонала. В последние десятилетия наиболее активно развивается серодиагностика в формате иммунохроматографических тестов (ИХ - тестов), что обусловлено их низкой стоимостью, скоростью проведения реакции (10-15 мин), возможностью использования метода в полевых условиях и визуальной оценки результатов [8,9]. Показано совпадение результатов, полученных с использованием ИХ-теста и ИФА, выявляющих IgM к ФГЛ-1 в 91% случаев при испытаниях на 739 образцах сывороток, собранных в высокоэндемичных районах Бразилии, Индонезии, Филиппин и Ганы, а так же в Нидерландах. Однако все перечисленные выше тесты показывают достаточно высокую чувствительность лишь для выявления МВ больных (94-97%) и существенно ниже в случае РВ и субклинических форм [10]. Хотя признано, что выявление серопозитивных контактных лиц позволит с высокой вероятностью прогнозировать их заболеваемость и повысить эффективность лечебных и профилактических мероприятий, до сих пор в практике нет экспрессных методов диагностики субклинических форм. Существуют лишь экспериментальные разработки тестов на основе цитокинов, которые могут быть перспективны при различных формах лепры, включая РВ форму лепры [11].

Ранее мы получили новые серодиагностические антигены путем синтеза нескольких микобактериальных углеводных эпитопов и конъюгирования их с БСА по отдельности и в комплексе. На основе таких гликопротеинов было проведено конструирование и предварительная оценка возможностей ИХ-тестов по серодиагностике различных форм лепры с использо-

ванием сывороток крови больных лепрой, контактных по лепре лиц и здоровых доноров [12]

Материал и методы. Антигенные конъюгаты.

Для конструирования ИХ-тестов использовали конъюгаты синтетических углеводных эпитопов видоспецифического антигена ФГЛ-1 и родоспецифического антигена ЛАМ микобактерий с БСА [12]:

– конъюгат на основе дисахаридного производного ФГЛ-1 (ФГЛ-1-БСА);

– конъюгат на основе синтезированного комплекса дисахаридного производного ФГЛ-1 и разветвлённого гексасахаридного фрагмента ЛАМ (ФГЛ-1/ЛАМ-БСА);

– конъюгат на основе диарабинофуранозного производного ЛАМ (ЛАМ-БСА).

Конъюгат коллоидного золота (КЗ) против IgM человека. Синтез КЗ проводили по методу Туркевича и Френса [13,14].

Размер золотых частиц оценивали методом W. Haïssy [15]. Оптимальную концентрацию иммуноглобулинов для конъюгирования с частицами золота определяли по методике Германсон [16].

Для конъюгирования к 10 мл КЗ с диаметром частиц 20 нм добавляли свежеприготовленный 1 % K_2CO_3 , доводя pH до 7,0. После этого к смеси добавляли водный раствор козьих иммуноглобулинов G против иммуноглобулинов M человека (Affini-Pure Goat Anti-Human IgM, Fc_γμ Fragment Specific (JacksonImmunoResearch)) в оптимальной концентрации и инкубировали при перемешивании 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли БСА до конечной концентрации 0,25%. Частицы с иммобилизованным белком отделяли центрифугированием при 20 000 g в течение 30 мин, далее дважды промывали в 0,01M фосфатно-солевом буфере (ФБР), pH 7,4, содержащем 0,3% БСА. После отбора супернатанта, осадок ресуспендировали в 1,5 мл буфера, содержащем 0,02 M трис, pH 8,2, 1% сахарозу, 1% БСА, 0,02% Твин-20 и 0,01% азид натрия. Полученный продукт разделяли на аликвоты по 50 мкл и хранили в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С.

Иммунохроматографические тесты (ИХ-тесты). Для конструирования ИХ-тестов в формате «deep stick» использовали материалы производства «Advanced Microdevices», Индия: нитроцеллюлозную мембрану пористостью 10 мкм на подложке TYPE-CNPF-SN12-L2-H50; стекловолоконный фильтр TYPE-PT-R5; сорбирующую подушечку

(TYPE-GFB-R4(0.35)); поглощающую подушечку (TYPE-AP 045). Растворы микобактериальных антигенных конъюгатов в ФБР для формирования аналитической зоны и раствор кроличьих иммуноглобулинов против козьих иммуноглобулинов («ИМТЕК», Россия) для формирования контрольной зоны наносили с помощью диспенсера IsoFlow («Imagene Technology», США) на нитроцеллюлозные мембраны в концентрации 0,5 мг/мл, со скоростью нанесения 4 мм/сек и объемом 0,2 мкл/мм. В качестве стабилизирующих добавок использовали 10-20 % глицерин, 1 % БСА, 0,01 % азид натрия. Раствор конъюгата КЗ с козьими IgG против IgM человека наносили на стекловолоконный фильтр со скоростью 8 мм/сек и в объеме 1,6 мкл/мм. Сушку мембран и фильтров с нанесенными реагентами проводили в климатической камере («Mettmert», Германия) при температуре (25±2) °С и влажности 25%. Собранный мультимембранный композит нарезали на полоски с помощью автоматического гильотинного нарезчика Index Cutter («A-Point Technologies», США) и упаковывали в пластиковые пробирки с помощью вакуумного упаковщика Voxel 35 («Henkelman», Голландия). Изготовленные ИХ-тесты хранили в холодильной камере при температуре от 2 до 8 °С.

Образцы сывороток крови. Для проверки ИХ-тестов использовали 22 сыворотки крови пациентов с многобактериальной формой лепры (МВ); 10 сывороток крови пациентов с малобактериальной формой лепры (РВ); 5 сывороток от контактных по лепре лиц (с неподтверждённым диагнозом лепры); 20 сывороток от здоровых доноров. Сыворотки были охарактеризованы, паспортизованы и получены из коллекции сывороток крови ФГБУ «НИИЛ» г. Астрахань.

Постановка иммунохроматографического анализа. Анализ проводили в трех повторностях. Необходимое количество ИХ-тестов выдерживали при комнатной температуре 15 минут. Сыворотки размораживали, разводили в 10 раз в 0,1 мл ФБР, pH 7,4 и вносили в лунку 96-луночного планшета. Затем в лунку вертикально погружали ИХ-тест и выдерживали в течение 15 мин, после чего тест извлекали, помещали на горизонтальную поверхность и проводили визуальный учёт результатов.

Результаты и обсуждение. Иммунохроматографический анализ 22 образцов сывороток крови больных многобактериальной формой лепры с вновь разработанными ИХ-тестами на основе трех синтетических гликоконъюгатов позволил получить 21 поло-

Результаты иммунохроматографического анализа с использованием экспериментальных образцов ИХ-тестов для ускоренной серодиагностики лепры

ИХ-тест для ускоренной серодиагностики лепры	Чувствительность для многобактериальных форм, n=22		Чувствительность для малобактериальных форм, n=10		Специфичность, n=25	
	Положительная реакция	Отрицательная реакция	Положительная реакция	Отрицательная реакция	Положительная реакция	Отрицательная реакция
№1 (ФГЛ-1-БСА)	21 (95,4%)	1 (4,6%)	6 (60%)	4 (40%)	-	25 (100%)
№2 (ФГЛ-1/ЛАМ-БСА)	21 (95,4%)	1 (4,6%)	8 (80%)	2 (20%)	-	25 (100%)
№3 (ЛАМ-БСА)	21 (95,4%)	1 (4,6%)	5 (50%)	5 (50%)	-	25 (100%)

жительный результат, свидетельствующий о чувствительности ИХ-тестов в отношении МВ формы заболевания на уровне 95,4% (см. таблицу).

При проведении анализа сывороток крови больных с малобактериальной формой лепры ($n=10$) установлен различный уровень чувствительности сконструированных ИХ-тестов. Так, ИХ-тест на основе конъюгата БСА с дисахаридной детерминантой ФГЛ-1 (ФГЛ-1-БСА) показал положительный результат с 6 образцами сывороток крови больных с РВ формой лепры, с 4 образцами сывороток крови больных из данной группы зарегистрирован ложноотрицательный результат. ИХ-тест на основе конъюгата БСА с синтетизированным комплексом дисахаридной детерминанты ФГЛ-1 и гексасахаридной детерминанты ЛАМ (ФГЛ-1/ЛАМ-БСА) позволил выявить 8 сывороток крови больных с РВ формой лепры при 2 ложноотрицательных результатах (чувствительность анализа составила 80%). При проведении анализа данной группы сывороток крови с использованием ИХ-теста сконструированного с использованием конъюгата БСА с диарабинофуранозным фрагментом ЛАМ (ЛАМ-БСА) положительный результат отмечен с 5 образцами сывороток крови, с 5 образцами сывороток крови – ложноотрицательный результат (чувствительность анализа составила 50%).

Иммунохроматографический анализ сывороток крови здоровых доноров ($n=20$) с вновь разработанными ИХ-тестами на основе трёх синтетических гликоконъюгатов показал отрицательный результат. Также зарегистрирован отрицательный результат при проведении анализа с сыворотками крови контактных по лепре лиц ($n=5$). Ложноположительных результатов анализа не выявлено. Таким образом, специфичность анализа с ИХ-тестами на основе всех использованных при конструировании конъюгатов составила 100%. Воспроизводимость анализа во всех случаях составила 100%.

Высокая чувствительность (95,4%) разработанных ИХ-тестов на основе трех синтетических гликоконъюгатов в отношении МВ формы заболевания связана с тем, что использованные фрагменты принадлежат к основным диагностически значимым микобактериальным антигенам. При анализе результатов исследования с сыворотками крови больных с РВ формой лепры, показано, что из трёх конъюгатов, в качестве биокомпонента ИХ-теста наиболее пригоден конъюгат БСА с синтетическим антигенным комплексом дисахаридного фрагмента ФГЛ-1 и разветвлённого гексасахаридного фрагмента ЛАМ (ФГЛ-1/ЛАМ-БСА). Наличие специфических антител к *M. leprae* с помощью сконструированного ИХ-теста установлено в 80% сывороток крови больных с РВ формой лепры. Данная чувствительность иммунохроматографического анализа обусловлена наличием в составе конъюгата комплекса фрагментов основных видо- и родоспецифичных микобактериальных антигенных эпитопов, на которые и происходит выработка антител в процессе заболевания лепрой. Сконструированные с использованием синтетических микобактериаль-

ных гликоконъюгатов ИХ-тесты высокоспецифичны в отношении сывороток крови здоровых доноров и контактных по лепре лиц.

Полученные в ходе работы данные позволяют сделать вывод о возможности использования синтетического гликоконъюгата на основе дисахаридного фрагмента ФГЛ-1 и разветвлённого гексасахаридного фрагмента ЛАМ в качестве компонента иммунохроматографических тестов для серодиагностики лепры.

Перспективность подхода по использованию конъюгатов (ФГЛ-1/ЛАМ-БСА) углеводных эпитопов микобактериальных антигенов в разработке серотестов на основе иммунохроматографии требует дальнейших исследований с использованием представительного набора сывороток больных различными формами лепры и лиц контактных по лепре.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР 056 и диссертационной работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13-16 см. REFERENCES)

- Образцова О.А. Молекулярно-биологические методы исследования в лабораторной диагностике лепры: эпидемиологический анализ, генетические детерминанты резистентности к антимикробным препаратам. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2017; (6): 34–40.
- Кондаков Н.Н., Мельникова Т.М., Чекрыжова Т.В., Мельникова М.В., Зинин А.И., Торгов В.И., Чижов А.О., Кононов Л.О. Синтез дисахарида фенольного гликолипида *Mycobacterium leprae* (PGL-1) и его конъюгатов с бычьим сывороточным альбумином. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2015; 64(5): 1142–8.
- Горбатов А.А., Соловьёв П.В., Баранова Е.В., Титарева Г.М., Куликалова Е.С., Бикетов С.Ф., Мазепа А.В. Сравнительное исследование экспериментальных и коммерческих серологических тестов для определения противотуберкулезных антител у людей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(10): 630–5.
- Федюкина Г.Н., Ветчинин С.С., Баранова Е.В., Рудницкий С.Ю., Соловьёв П.В., Колосова Н.В., Бикетов С.Ф. Получение компонентов иммунохроматографического теста для выявления возбудителей сапа и мелииоза. *Биотехнология*. 2015; 1: 85 – 92.
- Королёва-Ушакова А.Г., Баранова Е.В., Игнатов С.Г., Соловьёв П.В., Кондаков Н.Н., Мельникова Т.М., Аброна П.И., Подвальный Н.М., Кононов Л.О., Бикетов С.Ф. Сравнительная характеристика диагностического потенциала микобактериальных синтетических антигенов для серодиагностики лепры и туберкулеза. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019; 55(6): 608–16.

REFERENCES

- WHO режим доступа [http://www.who.int/neglected_diseases/news/WHO-to-publish-first-guidelines-on-leprosy-diagnosis/en/Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy](http://www.who.int/neglected_diseases/news/WHO-to-publish-first-guidelines-on-leprosy-diagnosis/en/Guidelines%20for%20the%20Diagnosis,%20Treatment%20and%20Prevention%20of%20Leprosy). Geneva. 28 June 2018.
- Obraztsova O.A. Molecular-biological Methods of Research in Laboratory Diagnostics of Leprosy: Epidemiological Analysis, Genetic Determinants of Resistance to Antimicrobial Drugs. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*. 2017; 6: 34–40. (in Russian)
- Spencer J.S., Kim H.J., Wheat W.H., Chatterjee D., Balagon M.V., Cellona R.V. et al. Analysis of Antibody Responses to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid I, Lipoarabinomannan, and Recombinant Proteins To Define Disease Subtype-Specific Antigenic Profiles in Leprosy. *Clinical and vaccine immunology*. 2011; 18(2): 260–7.

4. Abronina P.I., Podvalnyy N. M., Fedina K.G., Kondakov N.N., Zinin A.I., Chizhov A.O., Torgov V.I., Kachala V.V., Kononov L.O.. Synthesis of hexasaccharide fragment of lipoarabomannan from Mycobacteria: advantages of the benzylfree approach. *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. 2015; 5: 1149–62.
5. Kondakov N.N., Mel'nikova T.M., Mel'nikova M.V. Chekrizhova T.V., Zinin A.I., Chizhov A.O., Torgov V.I., Kononov L.O. Synthesis of the disaccharide phenolic glycolipid Mycobacterium leprae (PGL-I) and its conjugates with bovine serum albumin. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*. 2015; 64 (5): 1142-8. (in Russian)
6. Espinosa Omar Ariel, Ferreira S.M.B., Palacio F.G.L., Cortela Denise da Costa Boamorte, Ignotti E. Accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) in Detecting Antibodies against Mycobacterium leprae in Leprosy Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2018; Article ID 9828023, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/9828023>.
7. Penna M.L., Penna G.O., Iglesias P.C., Natal S., Rodrigues. Anti – PGL-I positivity as a risk marker for the development of leprosy among contacts of leprosy cases: systematic review and meta – analysis. *PLoS Neglected Tropical diseases*. 2016; 10(5): e004703, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004703>.
8. Gorbatov A.A., Soloviev P.V., Baranova E.V., Titareva G.M., Kulikalova E.S., Mazepa A.V., Biketov S.F. A comparative study of experimental and commercial serological tests for detection of antibodies in humans with tularemia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63(10): 630-5. (in Russian)
9. Fedukina G.N., Vetchinin S.S., Baranova E.V., Rudnitskii S.U., Soloviev P.V., Kolosova N.V., Biketov S.F. Obtaining components of immunochromatographic test to identify the causative agents of glanders and melioidosis. *Biotekhnologiya*. 2015; 1: 85 – 92. (in Russian)
10. Duthie M.S., Goto W., Ireton G.C., Reece S.T., Cardoso L.P.V., Martelli C.M.T., Stefani M.M.A., Nakatani M., de Jesus R.C., Netto E.M., Balagon M.V.F., Tan E., Gelber R.H., Maeda Y., Makino M., Hoft D., Reed S.G. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin. Vacc. Immunol*. 2007; 14: 1400-8.
11. Geluk A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. *Expert Opinion Med. Diagn*. 2013; 7(3): 265-74.
12. Korolyova-Ushakova A.G., Baranova E.V., Ignatov S.G., Soloviev P.V., Kondakov N.N., Mel'nikova T.M., Abronina P.I., Podval'niy N.M., Kononov L.O., Biketov S.F. Comparative characteristics of the diagnostic potential of mycobacterial synthetic antigens for serodiagnostics of leprosy and tuberculosis. *Prikladnaya biokhimiya I mikrobiologiya*. 2019; 55(6): 608-16. (in Russian)
13. Turkevich J., Stevenson P. C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*. 1951; 11- 5.
14. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*. 1973; 241(105): 20-2.
15. Haiss W., Nguyen T. K., Aveyard T.J., Fernig D.J. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem*. 2007; 79: 4215-21.
16. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. *Academic Press*. 1996; 813.

Поступила 28.01.20
Принята к печати 14.02.20

Борзова Н.Ю.¹, Иваненкова Н.И.², Сотникова Н.Ю.¹, Малышкина А.И.^{1,2}

НОВЫЕ РАННИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ИСХОДА БЕРЕМЕННОСТИ У ПАЦИЕНТОК С ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ

¹«Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ, 153045. Иваново, Россия;

²«Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, 153012. Иваново, Россия

Цель: определить новые критерии прогнозирования исхода беременности у женщин с привычным выкидышем на основании особенностей дифференцировки наивных клеток и Т-клеток памяти в популяциях Т-хелперов (CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺). Обследованы 61 женщина с угрожающим и привычным выкидышем в первом триместре гестации. В зависимости от исхода беременности было выделено 3 группы: в I группу вошли 39 женщины, у которых беременность завершилась своевременными родами; во II – 10 женщин с преждевременными родами; в III – 11 пациенток с ранним самопроизвольным выкидышем. Методом трехцветной проточной цитофлуориметрии в периферической венозной крови в популяциях CD8⁺ и CD4⁺ определялось содержание Tn, Tcm, Tem и Temra клеток. Статистический анализ осуществлялся в программах «Statistica for Windows 6.0», «Microsoft Excel 2010» и «MedCalc». При проведении ретроспективной оценки установлено, что в группе пациенток, чья беременность завершилась преждевременными родами, процентное содержание CD4⁺ Tem клеток памяти было достоверно выше, а CD4⁺ Tn – ниже, чем в группе со своевременными родами (p=0,013 и p=0,025 соответственно). У пациенток с ранним самопроизвольным выкидышем достоверно снижались уровни CD8⁺ Tn на фоне роста CD8⁺ Tem клеток памяти по сравнению с аналогичными параметрами пациенток со своевременными родами (p=0,040 и p=0,014 соответственно).

Прогнозирование самопроизвольного выкидыша возможно при значении CD4⁺ Tn равном 34,2% и менее (чувствительность – 100,0%, специфичность – 56,4%, точность – 63,8%), преждевременных родов – при значении CD4⁺ Tn равном 35,2% и менее (чувствительность – 66,7%, специфичность – 74,4% точность – 72,9%).

Таким образом, новые дополнительные критерии позволяют своевременно выявить группу риска и назначить адекватное лечение, направленное на пролонгирование желанной беременности.

Ключевые слова: привычный выкидыш; дифференцировка Т-лимфоцитов; Т-клетки памяти.

Для цитирования: Борзова Н.Ю., Иваненкова Н.И., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И. Новые ранние прогностические критерии исхода беременности у пациенток с привычным выкидышем. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 294-298. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-294-298>

Borzova N.Yu.¹, Ivanenkova N.I.², Sotnikova N.Yu.¹, Malysheva A.I.^{1,2}

NEW EARLY PROGNOSTIC CRITERIA FOR PREGNANCY OUTCOME IN WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGE

¹«Ivanovo Scientific Research Institute of Maternity and Childhood by V.N. Gorodkov» of Russian Ministry of health. Ivanovo, Russia;

²Ivanovo State Medical Academy. Ivanovo, Russia

To determine the new criteria for predicting the outcome of pregnancy in women with habitual abortion based on features of differentiation of naive T cells and memory cells in a population of T-helper (CD4⁺) and cytotoxic T lymphocytes (CD8⁺). The study involved 61 women with threatened and habitual abortion in the first trimester of gestation. Depending on the outcome of pregnancy was allocated to 3 groups: I went to 39 women whose pregnancy ended in timely delivery; in II – 10 women whose pregnancies ended in premature birth; in III – 11 patients in whom there was a spontaneous miscarriage. Using three-color flow cytometry as peripheral venous blood in populations of CD8⁺ and CD4⁺ determined by the content Tn, Tcm, Tem and Temra cells. Statistical analysis was carried out in the program «MicrosoftOffice 2010», «Statistica for Windows 6.0» and MedCalc». When conducting a retrospective assessment, it was found that in the group of patients whose pregnancy ended in preterm delivery, the percentage of CD4⁺ Tem memory cells was significantly higher and CD4⁺ Tn lower than in the subgroup with timely delivery (p = 0.013 and p = 0.025, respectively) In patients with early spontaneous miscarriage, the level of CD8⁺ Tn significantly decreased against the background of the growth of CD8⁺ Tem memory cells compared with the same parameters in patients with timely delivery (p = 0.040 and p = 0.014, respectively). Prediction of spontaneous abortion is possible up to CD4⁺ Tn equal to 34.2% or less (sensitivity – 100.0%, specificity – 56.4%, accuracy – 63.8%), premature birth – if the CD4⁺ Tn equal to 35.2% or less (sensitivity – 66.7%, specificity – 74.4% accuracy – 72.9%). Thus, the new criteria will allow additional time to identify risk and assign adequate treatment aimed at prolonging the desired pregnancy.

Key words: habitual miscarriage; differentiation of T cells; memory T-cells.

For citation: Borzova N.Yu., Ivanenkova N.I., Sotnikova N.Yu., Malysheva A.I. New early prognostic criteria for pregnancy outcome in women with recurrent miscarriage. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (5): 294-298. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-294-298>

For correspondence: Ivanenkova N.I., candidate of medical Sciences, assistant of the department of obstetrics and gynecology, medical genetics; e-mail: dr_ivanenkova@mail.ru

Information about authors:

Borzova N. <https://orcid.org/0000-0002-2247-3963>
Ivanenkova N. <https://orcid.org/0000-0002-4049-8160>
Sotnikova N. <https://orcid.org/0000-0002-0608-0692>
Malyshkina A. <https://orcid.org/0000-0002-1145-0563>

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 01.03.2020
Accepted 07.03.2020

Введение. Прерывание беременности в первом триместре многими учеными рассматривается не только как важная составляющая и неотъемлемая часть естественного отбора, но и как проявление первых серьезных нарушений в репродуктивном здоровье женщины, которое в дальнейшем может стать причиной привычной потери беременности. Частота привычного выкидыша среди всех желанных беременностей составляет 2 – 5% [1, 2]. Развитие угрозы прерывания в ранние сроки беременности приводит к повышению проницаемости формирующейся плацентарной ткани и ведет к усиленному поступлению клеток плодового происхождения в кровотоки матери, что может нарушать процесс дифференцировки клеток. Иммунные механизмы, протекающие в организме беременной женщины, играют крайне важную роль, а нарушение сложной цепочки иммунорегуляции может повлечь за собой возникновение патологии во время беременности (невынашивание беременности, задержка роста плода, преэклампсия и др.) [3-7].

Цель исследования: определить новые критерии прогнозирования исхода беременности у женщин с привычным выкидышем на основании особенностей дифференцировки наивных клеток и Т-клеток памяти в популяции Т-хелперов (Th, CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ, CD8⁺).

Материал и методы. На базе гинекологического стационара ФГБОУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ были отобраны 61 женщина с привычным выкидышем и угрозой прерывания на момент исследования (O20.0; O26.2 по МКБ-10) в первом триместре беременности. На участие в исследовании от каждой женщины было получено письменное информированное согласие. Путем ретроспективного анализа в зависимости от исхода беременности было выделено 3 группы пациенток: в I группу вошли 39 женщин, у которых беременность завершилась своевременными родами; во II – 10 женщин, с преждевременными родами; в III – 11 пациенток, с ранним самопроизвольным выкидышем. Материалом для исследования служила периферическая венозная кровь. Методом трехцветной проточной цитометрии в периферической венозной крови в популяциях Th и ЦТЛ определяли содержание наивных клеток – Tn (CD45RA⁺CD62L⁺), центральных клеток памяти – Tcm (CD45RA⁺CD62L⁺), претерминально-дифференцированных – Tem (CD45RA⁺CD62L⁻) и терминально-дифференцированных – Temra (CD45RA⁺CD62L⁻) клеток памяти на проточном цитофлюориметре FACSCantoII

в программе FACSDiva (Becton Dickinson, США). В работе использовали моноклональные антитела: анти-CD4 PerCP-Cy5.5 (clone OKT-4), анти-CD8 PerCP-Cy5.5 (clone RPA-T8), анти-CD45RA APC (clone HI100), анти-CD62L FITC (clone DREG-56), производства eBioscience (США).

Статистический анализ полученных результатов проводился по общепринятым методам вариационной статистики, после проверки рядов на нормальность распределения – по критериям Колмогорова — Смирнова и Шапиро — Уилка. Данные представлены в виде средней величины (M) и стандартной ошибки средней (m), статистическая значимость показателей в группах определялась по t-критерию Стьюдента и считали статистически значимой при уровне $p < 0,05$. Поиск точки разделения расчет чувствительности и специфичности проводился на основании построения кривой операционных характеристик (ROC-анализ). Статистический анализ осуществлялся с использованием пакетов прикладных лицензионных программ «Statistica for Windows 6.0», «Microsoft Excel 2010» и «MedCalc».

Результаты. Проведенный нами ретроспективный анализ полученных результатов показал, что при угрожающем и привычном выкидыше у пациенток, завершивших беременность преждевременными родами, процентное содержание клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻ в популяции периферических Th было достоверно выше, а клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ — ниже, по сравнению с показателями в группе женщин завершивших беременность родами в срок ($p=0,013$ и $p=0,025$ соответственно) (табл. 1). Статистически значимых различий в содержании CD4⁺ Tcm и CD4⁺ Temra клеток памяти между показателями I и II группы выявлено не было ($p>0,05$ во всех случаях). Проводя сравнительный анализ процентного содержания Tn, Tcm, Tem, Temra клеток памяти в популяции CD4⁺ лимфоцитов в группах с ранним самопроизвольным выкидышем и со своевременными родами достоверных различий не выявлено ($p>0,05$ во всех случаях).

Проводя оценку характера дифференцировки ЦТЛ на системном уровне у пациенток с угрожающим и привычным выкидышем в зависимости от исхода беременности (табл. 2) было установлено, что в группе женщин, завершивших беременность ранним самопроизвольным выкидышем отмечалось достоверное снижение пула Тn клеток на фоне роста пула Tem клеток памяти по сравнению с таковыми в группе женщин, завершивших беременность родами

в срок ($p=0,040$ и $p=0,014$ соответственно). Нами не было выявлено достоверных различий в содержании $CD8^+T_{cm}$ и $CD8^+T_{emra}$ клеток памяти в I и II группах ($p>0,05$ во всех случаях), как и в уровне наивных клеток и Т-клеток памяти в группах с преждевременными родами и родами в срок ($p>0,05$ во всех случаях).

В результате проведенного исследования были получены новые данные, которые позволили разработать дополнительные прогностические критерии раннего самопроизвольного выкидыша и преждевременных родов у женщин с привычным выкидышем и угрозой прерывания на момент исследования,

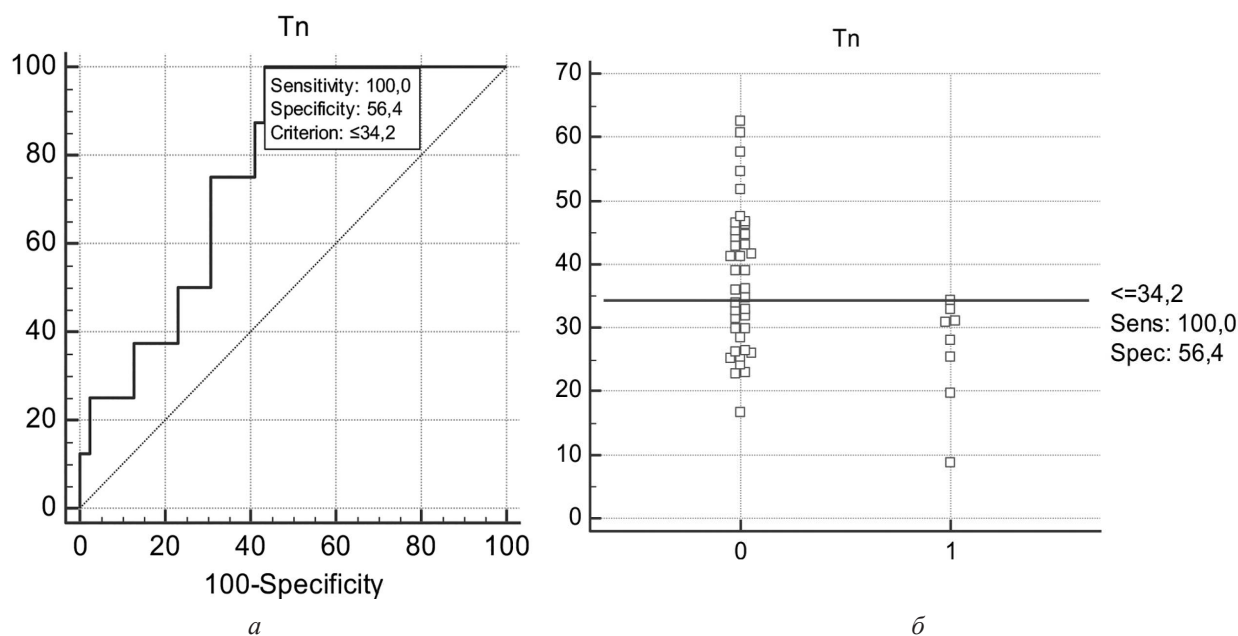


Рис. 1. ROC-анализ показателя наивных клеток в популяции периферических $CD8^+$ лимфоцитов при самопроизвольном выкидыше у женщин с привычным невынашиванием. а - ROC-кривая чувствительности (ось ординат) и специфичности (ось абсцисс) показателя относительного содержания $CD8^+Tn$; б - относительный показатель $CD8^+Tn$ в периферической венозной крови у женщин с привычным невынашиванием со своевременными родами (0) и с самопроизвольным выкидышем (1).

Таблица 1

Характер дифференцировки периферических Т-хелперов у женщин с угрожающим и привычным выкидышем в зависимости от исхода беременности, %

Показатель	Исход беременности		
	Своевременные роды ($n = 39$)	Преждевременные роды ($n = 10$)	Ранний самопроизвольный выкидыш ($n = 11$)
$CD45RA^+CD62L^+$ (Tn)	$41,67 \pm 1,86$	$34,48 \pm 2,32$ $p_1=0,025$	$36,43 \pm 3,69$
$CD45RA^-CD62L^+$ (Tem)	$32,42 \pm 1,58$	$32,14 \pm 2,18$	$31,86 \pm 2,03$
$CD45RA^-CD62L^-$ (Tem)	$21,04 \pm 1,76$	$29,88 \pm 2,63$ $p_1=0,013$	$28,15 \pm 4,17$
$CD45RA^+CD62L^-$ (Temra)	$4,32 \pm 0,73$	$3,51 \pm 1,04$	$3,60 \pm 0,69$

Примечание. p_1 - уровень статистической значимости между группами с преждевременными родами по сравнению с своевременными родами.

Таблица 2

Характер дифференцировки периферических цитотоксических Т-лимфоцитов у женщин с угрожающим и привычным выкидышем в зависимости от исхода беременности, %

Показатель	Исход беременности		
	Своевременные роды ($n = 39$)	Преждевременные роды ($n = 10$)	Ранний самопроизвольный выкидыш ($n = 11$)
$CD45RA^+CD62L^+$ (Tn)	$37,66 \pm 1,79$	$33,45 \pm 3,06$	$28,61 \pm 3,51$ $p_1=0,040$
$CD45RA^-CD62L^+$ (Tem)	$12,45 \pm 0,80$	$12,50 \pm 1,29$	$11,59 \pm 1,22$
$CD45RA^-CD62L^-$ (Tem)	$21,08 \pm 1,48$	$22,10 \pm 2,00$	$25,90 \pm 1,15$ $p_1=0,014$
$CD45RA^+CD62L^-$ (Temra)	$28,79 \pm 1,65$	$31,94 \pm 3,13$	$33,90 \pm 3,76$

Примечание. p_1 - уровень статистической значимости между группами с ранним самопроизвольным выкидышем по сравнению с своевременными родами.

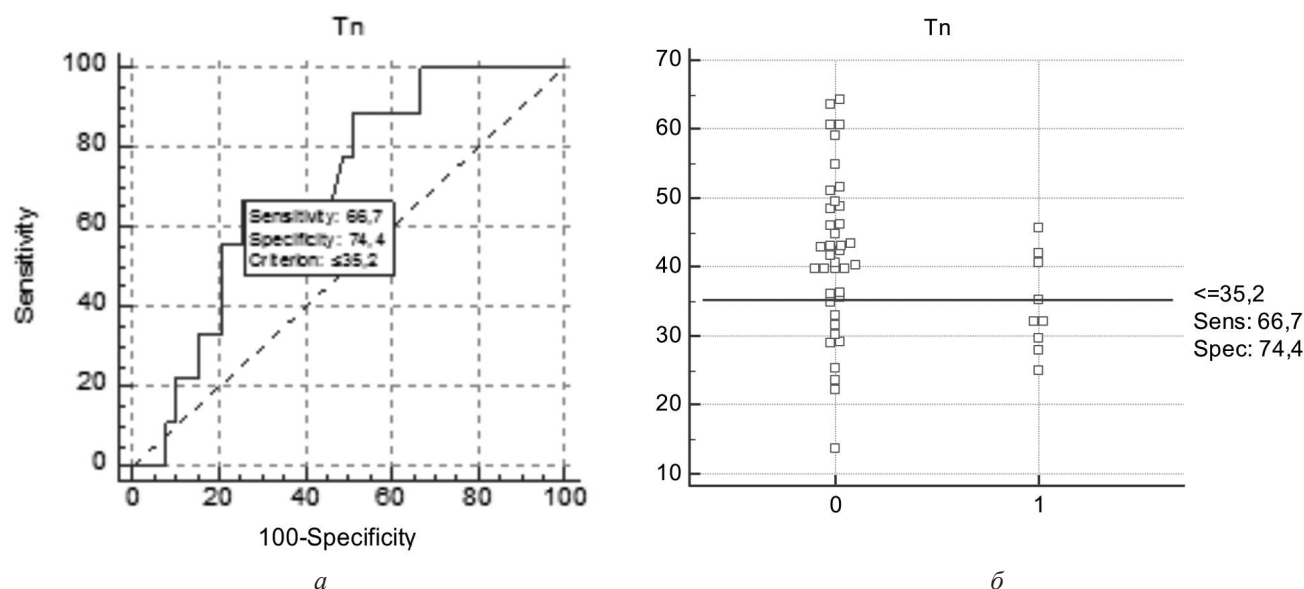


Рис. 2. ROC-анализ показателя наивных клеток в популяции периферических $CD4^+$ лимфоцитов при самопроизвольном выкидыше у женщин с привычным невынашиванием. *a* - ROC-кривая чувствительности (ось ординат) и специфичности (ось абсцисс) показателя относительного содержания $CD4^+Tn$; *б* - относительный показатель $CD4^+Tn$ в периферической венозной крови у женщин с привычным невынашиванием со своевременными родами (0) и с преждевременными родами (1).

Так, при уровне $CD8^+Tn$ равном 34,2% и менее, прогнозируют ранний самопроизвольный выкидыш. По результатам ROC-анализа площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,769, чувствительность данного показателя 100,0%, специфичность 56,4% и точность 63,8% (рис. 1, *a, б*).

При значении $CD4^+Tn$ равном 35,2% и менее возможно прогнозирование преждевременных родов. По результатам ROC-анализа площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,705, чувствительность данного показателя 66,7%, специфичность 74,4 % и точность 72,9% (рис. 2).

Обсуждение. Резюмируя вышесказанное, можно сделать вывод, что в группе пациенток с привычным выкидышем и угрозой прерывания на момент исследования, завершивших беременность ранним самопроизвольным выкидышем, происходили изменения в характере дифференцировки наивных клеток и Т-клеток памяти в популяции ЦТЛ, достоверно снижался пул Тn клеток на фоне роста пула Тem клеток памяти. В группе пациенток с преждевременными родами, достоверно повышалось процентное содержание клеток с фенотипом $CD45RA^-CD62L^-$ на фоне достоверного снижения уровня клеток с фенотипом $CD45RA^+CD62L^+$ в популяции периферических $CD4^+$ лимфоцитов. Известно, что функциональная активность Т-клеток памяти в популяции $CD8^+$ лимфоцитов нуждается в помощи $CD4^+$ Т-клеток [8]. Одним из основных компонентов эффекторной стадии иммунного ответа являются ЦТЛ, которые способны осуществлять цитолитическое действие в отношении клетки-мишени за счет продукции различных цитокинов и функциональных молекул, а также запуская процесс апоптоза. Успешное проте-

кание беременности зависит от хорошей адаптации материнской иммунной системы в ответ на постоянную стимуляцию клетками плодового происхождения. Т-клетки памяти обладают способностью запоминать ранее встречавшиеся антигены, что при повторных неудачных беременностях позволяет им вызывать более быстрый, существенный и сфокусированный ответ иммунной системы в отношении отцовско-фетальных антиген-специфических клеток, что может приводить к гибели плода [9]. Согласно полученным данным можно предположить, что при завершении беременности самопроизвольным выкидышем в ранние сроки происходит более стремительный процесс развития цитотоксических реакций, направленных на отторжение плода (эмбриона), в то время, как при преждевременных родах, изменения происходят только в популяции Т-хелперов, что говорит о более низкой антигенной стимуляции иммунной системы матери плодовыми клетками, позволяя пролонгировать гестационный срок. Полученные данные, позволили разработать новые, дополнительные ранние прогностические критерии досрочного прерывания беременности.

Заключение. Использование в качестве дополнительного раннего прогностического критерия самопроизвольного выкидыша у женщин с угрожающим и привычным выкидышем по уровню периферических $CD8^+Tn$ клеток и преждевременных родов по уровню $CD4^+Tn$ клеток, позволит своевременно выявить группы риска, назначить необходимую сохраняющую терапию, что позволит пролонгировать беременность до срока своевременных родов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7, 9 см. REFERENCES)

1. Кречетова Л.В., Тетруашвили Н.К., Хачатрян Н.А., Вторушина В.В., Степанова Е.О., Николаева М.А., Сухих Г.Т. Диагностическая значимость оценки фенотипа лимфоцитов периферической крови женщин с привычным невынашиванием. *Акушерство и гинекология*. 2015; 1: 25-31.
2. Трифонова Е.А., Ганъжа О.А., Габидулина Т.В., Девятьярова Л.Л., Сотникова Л.С., Степанов В.А. Генетические факторы в развитии привычного невынашивания беременности: обзор данных мета-анализов. *Акушерство и гинекология*. 2017; 4: 14-20. doi.org/10.18565/aig.2017.4.14-20.
3. Иваненкова Н.И., Борзова Н.Ю., Сотникова Н.Ю. Дифференцировка периферических Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов у женщин с привычным невынашиванием в зависимости от исхода беременности. *Медицинская Иммунология*. 2015; 17; 5: 267.
4. Кадырова Л.В., Борзова Н.Ю., Иваненкова Н.И. Особенности дифференцировки Т-лимфоцитов при невынашивании в ранние сроки гестации. *Российский иммунологический журнал*. 2013; 7; 16: 2.
5. Смирнова А.В., Борзова Н.Ю., Сотникова Н.Ю., Малышкина А.И. Особенности содержания растворимой формы рецептора для конечных продуктов гликозилирования при очень ранних угрожающих преждевременных родах. *Акушерство и гинекология*. 2017; 10: 35-9. doi.org/10.18565/aig.2017.10.35-9
6. Колобова А.В., Сотникова Н.Ю., Борзова Н.Ю. Содержание SRAGE и белка S100B при угрожающих преждевременных родах в сроке 22-27 недель. *Российский иммунологический журнал*. 2013; 7; 2-3: 313.
8. Ярилин А. А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.

REFERENCES

1. Krechetova L.V., Tetrushvili N.K., Khachatryan N.A., Vtorushina V.V., Stepanova E.O., Nikolaeva M.A., Sukhikh G.T. Diagnostic

- procedure for assessing the phenotype of peripheral blood lymphocytes in women with habitual miscarriage. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2015; 1: 25-31. (in Russian)
2. Trifonova E.A., Gan'zha O.A., Gabidulina T.V., Devjat'jarova L.L., Sotnikova L.S., Stepanov V.A. Genetic factors in the development of habitual miscarriage: a review of meta-analyses. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2017; 4: 14-20. doi.org/10.18565/aig.2017.4.14-20. (in Russian)
3. Ivanenkova N.I., Borzova N.Yu., Sotnikova N.Yu. Differentiation of peripheral T-helpers and cytotoxic T-lymphocytes in women with habitual miscarriage depending on the outcome of pregnancy. *Meditsinskaya Immunologiya*. 2015; 17; 5: 267. (in Russian)
4. Kadyrova L.V., Borzova N.Yu., Ivanenkova N.I. Features of differentiation of T-lymphocytes during miscarriage in the early stages of gestation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2013; 7; 16: 2. (in Russian)
5. Smirnova A.V., Borzova N.Yu., Sotnikova N.Yu., Malysheva A.I. Features of the content of the soluble form of the receptor for the final glycosylation products in very early threatening preterm delivery. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2017; 10: 35-9. doi.org/10.18565/aig.2017.10.35-39. (in Russian)
6. Kolobova A.V., Sotnikova N.Yu., Borzova N.Yu. The content of SRAGE and protein S100B in threatening preterm birth in the period of 22-27 weeks. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2013; 7; 2-3: 313. (in Russian)
7. Kieffer T.E.C., Scherjon S.A., Faas M.M., Prins J.R. Lower activation of CD4⁺ memory T cells in preeclampsia compared to healthy pregnancies persists postpartum. *J. Reprod. Immunol.* 2019; 136: 102613. doi: 10.1016/J.Jri.2019.102613.
8. Yarin A. A. Immunologiya. [Immunologiya]. Moscow: GEOTAR-Media; 2010. (in Russian)
9. Kieffer T.E.C., Laskewitz A., Scherjon S.A., Faas M.M., Prins J.R. Memory T cells in pregnancy. *Front Immunol.* 2019;10: 625. doi: 10.3389/Fimmu.2019.00625.

Поступила 01.03.20
Принята к печати 07.03.20

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Крошкина Н.В., Таланова И.Е., Куст А.В., Козелкова Е.В.

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

ФГБУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В.Н. Городкова» Минздрава РФ, 153045, Иваново, Россия

Проблеме привычной потери беременности в настоящее время посвящено множество исследований, и это внимание продиктовано сохраняющейся высокой частотой данного состояния. Патогенез привычного невынашивания беременности очень сложен и включает множество факторов, в настоящее время особо пристальное внимание уделяется иммунным аспектам. Существует мнение, что дисбаланс цитокинов может играть ключевую роль в патогенезе привычного невынашивания беременности. Проведено обследование 38 беременных женщин в сроке гестации 5-12 недель. Основную группу составили 17 женщин с привычным невынашиванием и угрозой прерывания на момент обследования, группу контроля – 21 женщина с неосложненным течением беременности и благоприятным анамнезом. Материалом исследования служила периферическая венозная кровь. Сывороточный уровень комплекса цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IFN γ , TNF α , GM-CSF определялся на мультиплексном флуоресцентном анализаторе Luminex 200 (Luminex Corporation, США). Значимые различия отмечались в сывороточном содержании IL-1 β , IL-22, IL-23 и IL-27, уровень которых был выше в основной группе по сравнению с группой здоровых беременных. При оценке сывороточного уровня цитокинов в основной группе имелись достаточно высокие значения IL-27 (25%) ($p < 0,05$), а TNF α – в 18% случаев ($p > 0,05$), тогда как в группе контроля не регистрировались. Достоверных различий в сывороточном содержании IL-2, IL-4, IL-9, IL-12p70, IL-18 и IFN γ в сравниваемых группах не отмечалось ($p > 0,05$). Одновременное повышение сывороточного уровня про- и противовоспалительных цитокинов, наблюдавшееся нами, можно объяснить как усилением иммунного ответа, так и запуском механизмов фетопroteкции. Неадекватная цитокиновая регуляция может являться предпосылкой для возникновения условий развития угрозы прерывания настоящей беременности у женщин с привычным невынашиванием.

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности; угроза прерывания; цитокины.

Для цитирования: Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Крошкина Н.В., Таланова И.Е., Куст А.В., Козелкова Е.В. Особенности содержания цитокинов периферической крови у беременных женщин с привычным невынашиванием беременности. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 299-303. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-299-303>

Malyshkina A.I., Sotnikova N.Y., Kroshkina N.V., Talanova I.E., Kust A.V., Kozelkova E.V.

PECULIARITIES OF THE CONTENT OF PERIPHERAL BLOOD CYTOKINES IN PREGNANT WOMEN WITH A HABITUAL MISCARRIAGE

V.N. Gorodkov Ivanovo Research Institute of Maternity and Childhood, Ministry of Health of Russia, Ivanovo

A lot of research nowadays is dedicated to the problem of habitual pregnancy loss, and this attention is dictated by the continued high frequency of this condition. The pathogenesis of habitual pregnancy loss is very complicated and includes many factors, at present especially close attention is paid to immune aspects. It is considered, that cytokine imbalance might play a key role in the pathogenesis of habitual pregnancy loss. Examination of 38 pregnant women was carried out at 5-12 weeks of gestation. The main group consisted of 17 women with habitual miscarriage and the threat of interruption at the time of the examination, the control group consisted of 21 women with uncomplicated pregnancy and a favorable obstetric history. As the material for investigation peripheral blood was used. Serum level of a complex of cytokines IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IFN γ , TNF α , GM-CSF was assessed on the Luminex 200 multiplex fluorescence analyzer (Luminex Corporation, USA). The significant differences in the serum level of IL-1 β , IL-22, IL-23 and IL-27 were observed between the groups, in the main group their level was higher comparing to that of healthy pregnant women. When evaluating the cytokines serum level, fairly high values of IL-27 (in 25% of cases) ($p < 0,05$), TNF α – (in 18% of cases) ($p > 0,05$) were found in the main group, while in the control group they were not registered. Significant differences in the serum level of IL-2, IL-4, IL-9, IL-12p70, IL-18 and IFN γ were not noted in the compared groups ($p > 0,05$). The simultaneous increase in the serum level of pro- and anti-inflammatory cytokines observed in our study can be explained by both an increase in the immune response and triggering of fetoprotection mechanisms. Inadequate cytokine regulation may be a prerequisite for the development of conditions for the development of a threat of termination of a real pregnancy in women with habitual miscarriage.

Key words: habitual miscarriage; threat of interruption; cytokines.

For citation: Malyshkina A.I., Sotnikova N.Y., Kroshkina N.V., Talanova I.E., Kust A.V., Kozelkova E.V. Peculiarities of the content of peripheral blood cytokines in pregnant women with a habitual miscarriage. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (5): 299-303 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-299-303>

For correspondence: Kozelkova Elena Vladimirovna, graduate student of the Department of Obstetrics and Gynecology, Neonatology, Anesthesiology and Intensive Care; e-mail: niimid.immune@mail.ru

Information about authors:

Malyshkina A.I. <http://orcid.org/0000-0002-1145-0563>

Sotnikova N.Y. <http://orcid.org/0000-0002-0608-0692>

Kroshkina N.V. <http://orcid.org/0000-0002-0428-6945>

Talanova I.E. <http://orcid.org/0000-0003-4950-8174>

Kust A.V. <http://orcid.org/0000-0002-1355-7225>

Kozelkova E.V. <http://orcid.org/0000-0003-4593-3771>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 01.03.2020
Accepted 07.03.2020

Введение. Привычная потеря беременности – самопроизвольное прерывание двух и более беременностей (по данным ВОЗ трех и более) – полиэтиологическое состояние, пусковым механизмом которого являются нарушения в репродуктивной системе [6, 7, 9, 14]. Этиология привычного невынашивания беременности различна [2, 6]. Среди причин преобладают материнские, такие как пороки развития матки (16%), генетические аномалии эмбриона (15%), перенесенные инфекционные заболевания матери во время беременности, аутоиммунные состояния, гормональные нарушения, хронический эндометрит [1, 2, 5]. В последние годы пристальное внимание уделяется иммунным аспектам данного осложнения [6, 11]. Любая успешная беременность является результатом сложной координации взаимодействия между иммунными клетками, которое опосредовано продуцируемыми ими цитокинами [3, 4, 11]. Изменения в этой сложной регуляторной сети во многом определяют развитие той или иной акушерской патологии. Существует мнение, что дисбаланс цитокинов может играть ключевую роль в патогенезе привычного невынашивания беременности [12, 13].

Цель данной работы – изучить клинические особенности, а также установить изменения содержания цитокинов в периферической крови, определяющих дифференцировку клеток иммунной системы и их функциональную активность, у беременных женщин с угрозой прерывания в ранние сроки и привычным невынашиванием.

Материал и методы. Для достижения поставленной цели на базе Ивановского НИИ материнства и детства им. В.Н.Городкова было проведено обследование 38 женщин в сроке гестации 5-12 нед: 17 из них имели установленный диагноз привычное невынашивание и угрожающий выкидыш на момент обследования (основная группа) и 21 женщина имела неосложненное течение беременности и неотягощенный акушерский анамнез (группа контроля). Основным критерием отбора в программу исследования являлись пациентки с диагнозом привычный выкидыш (имеющие в анамнезе 2 и более ранние потери беременности), прогрессирующая одноплодная маточная беременность в сроке 5 – 12 нед, наступившая в естественном цикле, информированное согласие пациентки на участие в исследовании. Критерии исключения:

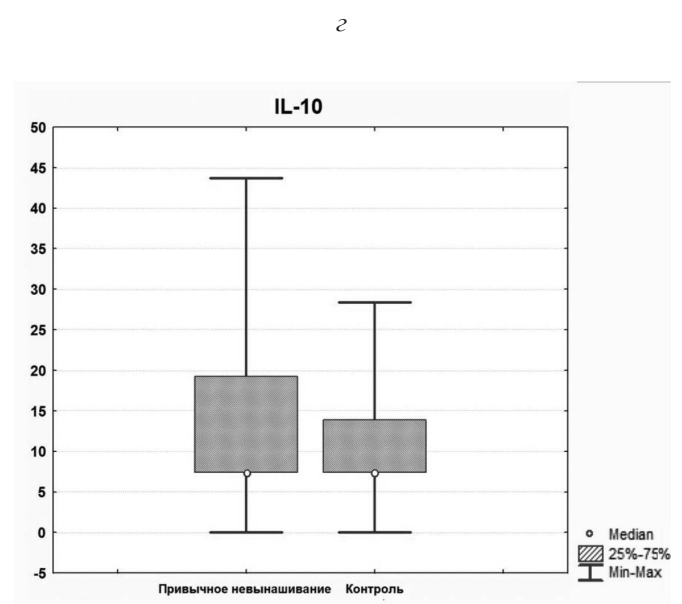
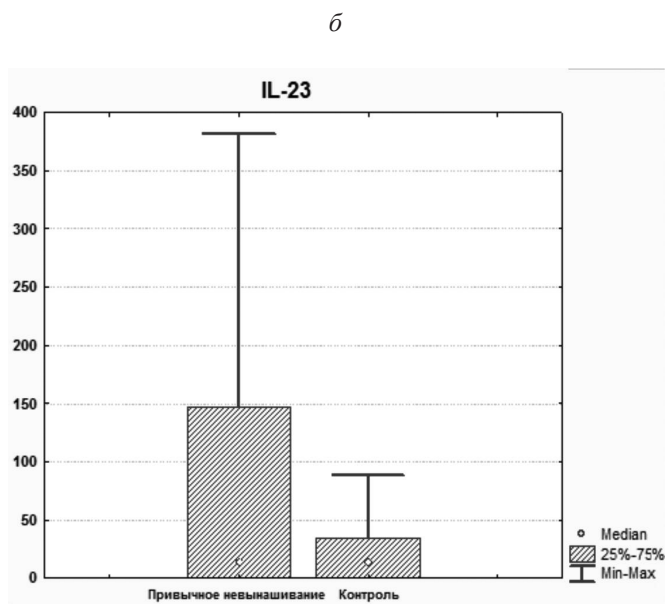
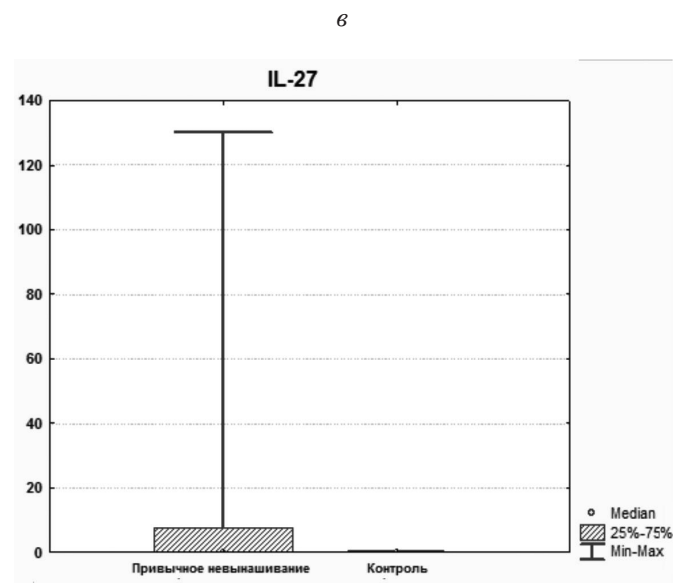
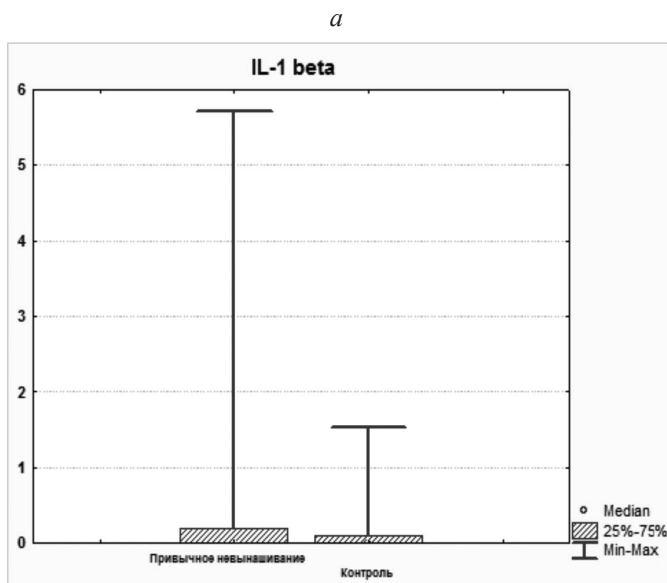
самопроизвольный выкидыш в ходу, беременность, наступившая в результате вспомогательных репродуктивных технологий, анэмбриония или другие достоверные признаки нежизнеспособной маточной беременности, многоплодная беременность, аномалии развития половой системы пациентки, соматические заболевания в стадии декомпенсации, структурные перестройки кариотипов супругов, установленные на предгравидарном этапе, тромбофилия, женщины с активной инфекцией и проявлением выраженных аллергических реакций на момент обследования. Материалом исследования являлась венозная периферическая кровь. Сывороточный уровень комплекса цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IFN γ , TNF α , GM-CSF определялся на мультиплексном флуоресцентном анализаторе Luminex 200 (Luminex Corporation, США). Полученные результаты обрабатывались традиционными методами статистического анализа в пакете прикладных лицензионных программ «Microsoft Office 2010» и «Statistica 13.0». Различия между группами определены при помощи критериев t Стьюдента и Манна-Уитни, между относительными показателями по критерию Хи-квадрат. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. С учетом нормальности распределения данные оценивались или в виде медианы с указанием 25-го и 75-го перцентилей (Me (Q25%–Q75%)), или как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm m$).

Результаты. Статистический анализ показал, что количество беременностей в анамнезе достоверно выше в группе с привычным невынашиванием по сравнению с группой контроля: $3,91 \pm 0,32$ и $2,0 \pm 0,25$ ($p < 0,05$). Количество выкидышей в анамнезе в основной группе также достоверно выше по сравнению с беременными группы контроля, и составляет $2,3 \pm 0,2$ и $0,08 \pm 0,1$ соответственно ($p < 0,001$). Достоверно чаще выявлено количество неразвивающихся беременностей в анамнезе в основной группе $1,29 \pm 0,2$, тогда как в контрольной группе данные осложнения не встречались ($p < 0,001$). Женщины основной группы достоверно чаще указывали на бактериальную и вирусную инфекцию в анамнезе ($p < 0,004$), по поводу которой проводилось этиологическое и противовоспалительное лечение. Также в основной группе

женщин достоверно чаще выявлялся хронический эндометрит ($p < 0,02$). Среди пациенток с привычным невынашиванием достоверно чаще отмечались внутриматочные вмешательства – выскабливание полости матки ($p < 0,001$). При обследовании женщин основной группы достоверно чаще выявлялся риск тромбофилии – в 67% случаев, в отличие от женщин контрольной группы, где данная патология не встречалась ($p < 0,001$).

При оценке сывороточного уровня цитокинов было выявлено, что достаточно высокие значения концентрации IL-27 (15–130 пкг/мл) отмечались в 25%

случаев в группе с привычным невынашиванием беременности ($p < 0,002$), в то время как в контрольной группе данный цитокин не определялся. Наиболее значимые различия отмечались в частоте выявления IL-1 β , IL-22 и IL-23, уровень которых достоверно повышался в группе с привычным невынашиванием по сравнению с группой здоровых беременных ($p = 0,044$, $p = 0,018$ и $p = 0,002$, соответственно). Содержание IL-21 в сыворотке крови в группе женщин с привычным невынашиванием в 2,3 раза был выше, чем в контрольной группе (32% и 14%, соответственно), однако достоверные различия по данному показателю



Сывороточный уровень цитокинов в сравниваемых группах. *a* – сывороточный уровень IL-1beta в группе с привычным невынашиванием и группе контроля ($p = 0,044$); *б* – сывороточный уровень IL-23 в группе с привычным невынашиванием и группе контроля ($p = 0,002$); *в* – сывороточный уровень IL-27 в группе с привычным невынашиванием и группе контроля ($p < 0,002$); *г* – сывороточный уровень IL-10 в группе с привычным невынашиванием и группе контроля ($p < 0,05$).

в группах отсутствовали ($p>0,05$). В основной группе в 18% случаев в незначительных концентрациях (1–14 пкг/мл) выявлялся TNF α ($p>0,05$), тогда как в контрольной группе он не регистрировался. Также, в группе с привычным невынашиванием в сыворотке крови уровень IL-10 достоверно превышал показатели в контрольной группе ($p<0,05$) (см. рисунок).

В основной группе имелась тенденция к повышению уровня IL-13 ($p>0,05$). При оценке сыровоточного содержания цитокинов было выявлено, что уровень IL-5, IL-6, IL-17A и GM-CSF был ниже детектируемых значений у женщин с неосложненным течением беременности и, лишь в единичных случаях, регистрировался у женщин основной группы ($p>0,05$ во всех случаях). Достоверных различий в сыровоточном содержании IL-2, IL-4, IL-9, IL-12p70, IL-18 и IFN γ в сравниваемых группах не отмечалось ($p>0,05$).

Обсуждение. Установлено, что для женщин с привычным невынашиванием в отличие от пациенток с неосложненным течением беременности наиболее характерно наличие в анамнезе внутриматочных вмешательств, хронического эндометрита, бактериальной и вирусной инфекции генитального тракта, риска тромбофилии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при привычном невынашивании беременности на системном уровне невозможно четко определить доминирующее влияние Th1 или Th2 клеток. Высокий сыровоточный уровень IL-1 β , наряду с тенденцией к повышению содержания TNF α при привычном невынашивании беременности создают условия для дифференцировки клеток макрофагального ряда в сторону M1 подтипа и выработки ими провоспалительных цитокинов, в том числе IL-23. Выявленное нами повышение сыровоточного уровня IL-21 позволяет предположить участие В-лимфоцитов в данном процессе при привычном невынашивании беременности. IL-21, активируя фолликулярные Tfh, поддерживает дифференцировку В-клеток в плазмобласты и в долгоживущие В-клетки памяти. IL-27 играет двойственную роль. С одной стороны, высокие концентрации IL-27 активируют цитотоксические Т-лимфоциты и натуральные киллеры, что способствует развитию воспалительной реакции. С другой стороны, IL-27 подавляет продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами, и индуцирует продукцию IL-10 инвариантными регуляторными Т-лимфоцитами. IL-10 создает условия для дифференцировки клеток макрофагального ряда в сторону M2 подтипа, что включает протективные механизмы.

Заключение. Одновременное повышение сыровоточного уровня про- и противовоспалительных цитокинов можно объяснить как усилением иммунного ответа, так и запуском механизмов фетопротекции. Неадекватная цитокиновая регуляция может являться предпосылкой для возникновения условий развития угрозы прерывания настоящей беременности у женщин с привычным невынашиванием.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhao X., Jiang Y., Wang L., Li Z., Li Q., Feng X. Advances in understanding the immune imbalance between T-lymphocyte subsets and NK cells in recurrent spontaneous abortion. *Geburtshilfe Fraunheilkd.* 2018; 78(7): 677–83.
2. modulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. *PLoS One.* 2011; 6(5): e20245.
3. Zotos D., Coquet J. M., Zhang Y., Light A., D'Costa K., Kallies A. et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 2010; 207(2): 365–78.
4. Caprioli F., Sarra M., Caruso R., Stolfi C., Fina D., Sica G. et al. Autocrine regulation of IL-21 production in human T lymphocytes. *J. Immunol.* 2008; 180(3): 1800–7.
5. Dekel N., Gnainsky Y., Granot I., Mor G. Inflammation and implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63(1): 17–21.
6. Батрак Н.В., Малышкина А.И., Крошкина Н.В. Иммунологические аспекты привычного невынашивания беременности. *Акушерство и гинекология.* 2014; 12: 10–4.
7. Савельева Г.М., Сухих Г.Т., Серов В.Н., Радзинский В.Е., ред. Акушерство. Национальное руководство. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015.
8. Копобаева И. Л. Привычное невынашивание беременности. *Journal Medicine.* 2015; 8 (158): 57–62.
9. Сарибегова В.А., Тетруашвили Н.К., Кречетова Л.В., Агаджанова А.А., Вторушина В.В. Течение и исходы беременности у женщин с идиопатическим привычным выкидышем при использовании иммуноцитотерапии. *Акушерство и гинекология.* 2017; 8: 68–73.
10. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 2012; 98 (5): 1103–11.
11. Левкович М.А., Нефедова Д.Д., Цатурян Л.Д., Бердичевская Е.М. Иммунологические аспекты проблемы невынашивания беременности. *Современные проблемы науки и образования.* 2016; 3: 186.
12. Малышев И.Ю. Эпигенетические, посттранскрипционные и метаболические механизмы репрограммирования макрофагов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2015; 59(2): 99–111.
13. Fang-Yu Tsao, Ming-Yih Wu, Yih-Leong Chang, Chen-Tu Wu, Hong-Nerng Ho. M1 macrophages decrease in the deciduae from normal pregnancies but not from spontaneous abortions or unexplained recurrent spontaneous abortions. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2018; 117: 204–11.
14. Савельева Г.М., Аксененко В.А., Андреева М.Д. и др. Терапия привычного выкидыша микронизированным прогестероном (результаты многоцентрового исследования ТРИСТАН-1). *Акушерство и гинекология.* 2017; 11: 44–55.

REFERENCES

1. Zhao X., Jiang Y., Wang L., Li Z., Li Q., Feng X. Advances in understanding the immune imbalance between T-lymphocyte subsets and NK cells in recurrent spontaneous abortion. *Geburtshilfe Fraunheilkd.* 2018; 78(7): 677–83.
2. Southcombe J., Tannetta D., Redman C., Sargent I. The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles. *PLoS One.* 2011; 6(5): e20245.
3. Zotos D., Coquet J. M., Zhang Y., Light A., D'Costa K., Kallies A. et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 2010; 207(2): 365–78.
4. Caprioli F., Sarra M., Caruso R., Stolfi C., Fina D., Sica G. et al.

- Autocrine regulation of IL-21 production in human T lymphocytes. *J. Immunol.* 2008; 180(3): 1800–7.
5. Dekel N., Gnainsky Y., Granot I., Mor G. Inflammation and implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63(1): 17-21.
 6. Batrak N.V., Malysheva A.I., Kroshkina N.V. Immunological aspects of habitual miscarriage. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2014; 12: 10-4. (in Russian)
 7. Savel'eva G.M., Suhih G.T., Serov V.N., Radzinskiy V.E., eds. Obstetrics. [Natsional'noe rukovodstvo]. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2015: 189-98. (in Russian)
 8. Kopobaeva I. L. Habitual miscarriage. *Journal Medicine.* 2015; 8 (158): 57–62. (in Russian)
 9. Saribegova V.A., Tetrushvili N.K., Krechetova L.V., Agadzhanova A.A., Vtorushina V.V. The course and outcomes of pregnancy in women with the usual idiopathic miscarriage when using immunocytotherapy. *Akusherstvo i ginekologiya.* 2017; 8: 68-73. (in Russian)
 10. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 2012; 98 (5): 1103-11.
 11. Levkovich M.A., Nefedova D.D., Caturyan L.D., Berdichevskaya E.M. Immunological aspects of the problem of miscarriage. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2016; 3: 186. (in Russian)
 12. Malyshev I.Yu. Epigenetic, post-transcriptional and metabolic mechanisms of macrophage reprogramming. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2015; 59 (3): 99-111. (in Russian)
 13. Fang-Yu Tsao, Ming-Yih Wu, Yih-Leong Chang, Chen-Tu Wu, Hong-Nerng Ho. M1 macrophages decrease in the deciduae from normal pregnancies but not from spontaneous abortions or unexplained recurrent spontaneous abortions. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2018; 117: 204-11.
 14. Savel'eva G.M., Aksenenko V.A., Andreeva M.D. et al. Therapy of habitual miscarriage with micronized progesterone (results of a multicenter study TRISTAN-1). *Akusherstvo i ginekologiya.* 2017; 11: 44-55. (in Russian)

Поступила 01.03.20

Принята к печати 07.03.20

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Маркелова Е.А.¹, Лутай Ю.А.²

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ У БОЛЬНЫХ ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА

¹ФГБУ «Информационно методический центр по экспертизе учета и анализу средств медицинского применения» Минздрава РФ, 305040, Курск, Россия;

²ФГАОУ ВО «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского» Министерства науки и высшего образования РФ, 295051, Симферополь, Россия

Метаболический синдром (МС) считается возраст-ассоциированной патологией, часто сочетающийся с артериальной гипертензией (АГ) и имеет высокую распространенность в пожилом возрасте. Однако сравнительное исследование широкого спектра провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов с оценкой их информативности у пожилых больных МС с АГ не проводилось. Цель исследования – совершенствование диагностики МС с АГ у больных пожилого возраста на основе анализа информативности сывороточных интерлейкинов. Содержание интерлейкинов в сыворотке крови изучено у 86 больных МС с АГ в возрасте 60-75 лет и 35 лиц без МС и АГ, сопоставимых по возрасту и полу. Установлено, что для диагностики МС в сочетании с АГ в качестве ведущих лабораторных маркеров системного иммунитета необходимо использовать высокоинформативные ИЛ – 8, ИЛ – 1В, ИЛ – 4 и ИЛ – 10. Другие сывороточные интерлейкины (ИЛ – 6, ИЛ – 2, TNF – α, интерферон – γ, интерферон – α и ИЛ – 18) могут рассматриваться как дополнительные маркеры при диагностике МС с АГ в пожилом возрасте.

Ключевые слова: метаболический синдром; артериальная гипертензия; интерлейкины крови; пожилой возраст.

Для цитирования: Маркелова Е.А., Лутай Ю.А. Совершенствование лабораторной диагностики метаболического синдрома с артериальной гипертензией у больных пожилого возраста. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 304-307. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-304-307>

Markelova E. A.¹, Lutay Yu.A.²

IMPROVEMENT OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF METABOLIC SYNDROME WITH ARTERIAL HYPERTENSION IN ELDERLY PATIENTS

¹FSBI «Information and methodological center for examination accounting and analysis of medical products» of the Ministry of health of the Russian Federation, 305040, Kursk, Russia;

²FGOU VPO «Medical Academy. S. I. Georgievsky» Ministry of science and higher education of the Russian Federation, 295051, Simferopol, Russia

Metabolic syndrome (MS) is considered an age-associated pathology, often combined with hypertension (AH) and has a high prevalence in the elderly. However, a comparative study of the broad spectrum of proinflammatory and anti-inflammatory interleukins with an assessment of their informative value in elderly patients WITH MS with AH was not carried out. The aim of the study was to improve the diagnosis of MS with hypertension in elderly patients based on the analysis of the informativity of serum interleukins. The content of interleukins in serum was studied in 86 patients with MS and AH aged 60-75 years and 35 persons without MS and AH, comparable in age and sex. It was found that for the diagnosis of MS in combination with AH as the leading laboratory markers of systemic immunity it is necessary to use highly informative IL-8, IL-1B, IL-4 and IL-10. Other serum interleukins (IL-6, IL-2, TNF-α, interferon-γ, interferon-α and IL-18) can be considered as additional markers in the diagnosis of MS with hypertension in the elderly.

Key words: metabolic syndrome; arterial hypertension; blood interleukins; old age.

For correspondence: Markelova Elena Aleksandrovna, doctor, e-mail: paul.burlacov@yandex.ru

For citation: Markelova E. A., Lutay Yu.A. Improvement of laboratory diagnostics of metabolic syndrome with arterial hypertension in elderly patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (5): 299-303 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-304-307>

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.12.2019
Accepted 15.01.2020

В выполненных эпидемиологических исследованиях последних лет показано, что распространенность метаболического синдрома (МС) во взрослой популяции составляет до 24% и прослеживается тенденция увеличения частоты МС с увеличением возраста [11].

Для корреспонденции: Маркелова Елена Александровна, врач;
e-mail: paul.burlacov@yandex.ru

В настоящее время МС рассматривается как заболевание, ассоциированное с возрастом [9]. Однако при изучении МС проводится чрезвычайно мало исследований по анализу возрастных особенностей данной патологии, в том числе у лиц пожилого и старческого возраста [4,8].

Современная демографическая ситуация характеризуется стремительным ростом популяции пожилых людей в мире, в том числе и в России. В настоящее

время примерно 12-15% населения планеты составляют люди старше 65 лет, причем к 2030 г. их численность возрастёт по меньшей мере в 2 раза [9], а к 2050 г., по прогнозам экспертов ВОЗ, достигнет 25% [2,3]. Среди пожилого населения МС встречается значительно чаще (30-40%), чем у лиц молодого и среднего возраста [10]. У больных пожилого и старческого возраста МС протекает тяжелее, с более выраженными нарушениями углеводного обмена и поражениями сердечно-сосудистой системы [12].

В развитии и прогрессировании сердечно-сосудистых осложнений и МС в последнее время важное значение придается дисбалансу сывороточных провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов [13, 15]. Однако данные о связи между концентрацией интерлейкинов на системном уровне и развитием МС в сочетании с артериальной гипертензией (АГ) единичны и противоречивы [7, 14]. Публикаций, посвященных изучению системного интерлейкинового статуса у больных МС в сочетании с АГ в пожилом возрасте, не обнаружено. Поэтому выявление новых лабораторных предикторов МС, которыми могут являться интерлейкины сывотки крови, в том числе у пожилых пациентов, представляет научно-практический интерес. Однако спектр таких лабораторных параметров среди интерлейкинов достаточно широк, что требует выделения наиболее диагностически значимых.

Цель исследования – совершенствование диагностики МС с АГ у больных пожилого возраста на основе анализа информативности сывороточных интерлейкинов.

Материал и методы. Обследовано в клинических условиях 86 больных МС и АГ в возрасте 60-75 лет (основная группа). Критериями включения являлись: возраст 60-75 лет, наличие МС, первичная АГ – II-III степени, отсутствие острого инфаркта миокарда, злокачественных новообразований, нарушений мозгового кровообращения, почечной недостаточности за последние 6 месяцев. Диагностика МС и АГ проводилась в соответствии с Рекомендациями экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению МС [10].

Контролем служили 35 лиц без МС и АГ, сопоставимых по возрасту и полу.

Уровень интерлейкинов в сывотке крови определяли иммуноферментным методом с помощью набора «Протеиновый контур» (г. Санкт-Петербург).

Для выделения диагностически значимых сывороточных интерлейкинов рассчитывали отношение шансов (ОШ) по формуле:

$$\text{ОШ} = (a*d)/(b*c),$$

где *a* – наличие данного показателя в основной группе, *b* – отсутствие данного показателя в основной группе, *c* – наличие этого показателя в контрольной группе, *d* – отсутствие данного показателя в контрольной группе [6].

Вычисляли также доверительный интервал ОШ для изучаемых интерлейкинов крови и их достоверность. Недостоверные ОШ исключались из анализа, а достоверные интерлейкины крови рассматривались в качестве информативных лабораторных показателей диагностики МС с АГ.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы “Statistica 6.0” и непараметрического критерия Вилкоксона.

Результаты и обсуждение. Анализ содержания сывороточных интерлейкинов у представителей сравниваемых групп выявил достоверные различия по всем изученным интерлейкинам (табл. 1). В наибольшей степени у больных с МС и АГ пожилого возраста произошло повышение уровня ИЛ-8 в сывотке крови. Значительное увеличение у пациентов основной группы характерно для содержания на системном уровне ИЛ-1β. Существенные изменения установлены также в содержании сывороточных интерлейкинов ИЛ-2 и ИЛ-6, уровень которых как и рассмотренных выше репрезентативно возрос по отношению к контрольной группе. Менее значительно в сравнении с рассмотренными интерлейкинами повысилось содержание в сывотке TNF-α и интерферона-γ, причем их увеличение практически эквивалентное, но с достоверной разницей против контрольной группы.

Содержание ИЛ-4, интерферона-α, ИЛ-10 и ИЛ-18 в сывотке крови больных МС с АГ, напротив, достоверно снизилось. Максимальное уменьшение сывороточных интерлейкинов у пациентов основной группы выявлено для ИЛ-4. Незначительно ниже в сравнении с ИЛ-4 наблюдается понижение сывороточного ИЛ-10. Следует обратить внимание также на то, что при сочетании МС с АГ у пациентов в пожилом возрасте происходит значительное репрезентативное снижение ИЛ-18. В меньшей степени понизился уровень в сывотке крови интерферона-α.

В единичных исследованиях [7, 13] изучены лишь отдельные сывороточные интерлейкины (ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-18) у больных с МС. Показано, что уровень ИЛ-6 в сывотке больных АГ с МС составляет 158,4±5,2 пг/мл, что достоверно выше, чем у пациентов с АГ (122,4±1,2 пг/мл) и здоровых лиц (13,6±1,2 пг/мл). Аналогичное соотношение установлено и для сывороточного ИЛ-10 – 24,6±1,7 пг/мл, 18,2±1,6 пг/мл и 13,1±3,2 пг/мл соответственно с достоверным различием лишь для больных АГ и МС и АГ. Авторы утверждают об активации у больных АГ с МС провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов,

Таблица 1

Содержание интерлейкинов в сывотке крови в основной и контрольной группах (M±m)

Интерлейкины, пг/мл	Больные с МС и АГ, 60-75 лет	Лица без МС и АГ, 60-75 лет	p
ИЛ-1β	72,4 ±2,8	10,3 ±1,2	<0,001
ИЛ-6	64,7±2,4	15,8±1,9	<0,001
ИЛ-2	204,5±3,6	63,7±3,3	<0,001
ИЛ-8	49,6±3,1	5,0±1,6	<0,001
TNF-α	14,8±1,3	6,8±1,7	<0,001
Интерферон-γ	28,2±1,5	13,4±1,1	<0,001
Интерферон-α	17,5±1,2	26,9±1,2	<0,001
ИЛ-4	1,1±0,1	4,4±0,3	<0,001
ИЛ-10	5,2±0,3	19,5±1,2	<0,001
ИЛ-18	76,7±4,2	215,6±6,3	<0,001

Таблица 2

Отношение шансов для сывороточных интерлейкинов в диагностике МС с АГ у пожилых

Интерлейкин, пг/мл	Отношение шансов	Доверительный интервал	<i>p</i>
ИЛ-1β	4,965	4,327-5,485	<0,0001
ИЛ-2	2,754	2,544-3,286	<0,0003
ИЛ-6	2,082	1,821-2,548	<0,0028
ИЛ-8	7,281	6,864-7,8250	<0,0001
TNF-α	1,828	1,541-2,347	<0,0064
Интерферон-γ	1,603	1,286-1,825	<0,0032
Интерферон-α	1,765	1,315-1,942	<0,0054
ИЛ-4	4,287	4,012-4,645	<0,0001
ИЛ-10	3,642	3,104-3,948	<0,0001
ИЛ-18	1,856	1,613-2,285	<0,0068

что, по их мнению, вероятно, имеет компенсаторный характер при изучаемой патологии [13].

У больных АГ 2 степени и сахарным диабетом по сравнению с пациентами с АГ без сахарного диабета наблюдается достоверное повышение сывороточного ИЛ-6 и ИЛ-18 [7]. В других же известных публикациях представлены результаты изменения сывороточных ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-4 и ИЛ-10 у больных АГ в сравнении со здоровыми лицами [1,2], в которых установлено повышение ИЛ-1, ИЛ-6 и, наоборот, снижение – ИЛ-4 и ИЛ-10 у пациентов с АГ. Эти данные не противоречат полученным нами результатам при обследовании больных МС с АГ. У студентов с АГ выявлено достоверное повышение в сыворотке крови ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИЛ-8 [5]. Однако информация о других сывороточных интерлейкинах у больных АГ с МС и без МС в научной литературе не представлена, равно как и отсутствуют данные об информативности какого-либо интерлейкина, что затрудняет отбор диагностически значимых интерлейкинов.

Впервые выполненная нами оценка информативности сывороточных интерлейкинов для совершенствования лабораторной диагностики МС с АГ у пожилых показывает, что наибольшей диагностической значимостью по величине ОШ обладает ИЛ – 8 (табл. 2), которая существенно превосходит показатели ОШ, установленные для других интерлейкинов крови. Высокой информативностью для диагностики МС с АГ в пожилом возрасте среди изученных сывороточных интерлейкинов обладают ИЛ1β и ИЛ-4. Последний, как известно, относится к группе противовоспалительных интерлейкинов и, наряду с другим противовоспалительным интерлейкином – ИЛ-10, может рассматриваться в качестве ведущего маркера МС, сочетанного с АГ.

Для указанных выше сывороточных интерлейкинов ОШ являются достоверными, что позволяет их рекомендовать для диагностики МС с АГ в пожилом возрасте.

Остальные сывороточные интерлейкины характеризуются меньшей информативностью, величина ОШ которых варьирует от 1,603 для интерферона – γ до 2,754 – для ИЛ – 2. Данные интерлейкины сыво-

ротки крови следует отнести к дополнительным лабораторным маркерам для диагностики обсуждаемой патологии. В эту группу сывороточных интерлейкинов, имеющих статистически достоверную значимость, включены ИЛ-2, ИЛ-6, TNF-α, интерферон-γ, интерферон-α, ИЛ-18.

Закключение. Выполненный впервые анализ широкого спектра сывороточных интерлейкинов у пожилых больных МС в сочетании с АГ выявил дисбаланс провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов, проявляющихся в первую очередь значительным повышением ИЛ – 8, ИЛ – 1β, ИЛ-2 и угнетением синтеза противовоспалительных интерлейкинов – ИЛ – 4 и ИЛ – 10. На основе расчета отношения шансов впервые установлена информативность интерлейкинов крови, среди которых ведущими для лабораторной диагностики МС и АГ являются ИЛ-8, ИЛ-1β, ИЛ-4 и ИЛ-10.

Содержание в сыворотке крови у больных пожилого возраста ИЛ-6, ИЛ-2, TNF-α, интерферон-α, интерферон-γ, ИЛ-18 следует рассматривать в качестве дополнительных маркеров верификации МС с АГ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 14, 15 см. REFERENCES)

1. Адаменко Г.П., Головки Е.С., Скребло Е.И., Тихон Т.В. Маркеры внутрисосудистого воспаления и профиля цитокинов при артериальной гипертензии. *Проблемы здоровья и экологии*. 2014; 2: 10–44.
2. Адаменко Г.П., Скребло Е.И., Головки Е.С., Тихон Т.В. Взаимосвязь лабораторных показателей гемостазиологического статуса, маркеров цитокинов с лимфоцитозом периферической крови при артериальной гипертензии с гипертрофией миокарда левого желудочка. *Кардиология в Беларуси*. 2015; 6(43): 73-83.
3. Амантай А.Т., Бердыгалиев А.Б., Қайнарбаева М.С. Выявление рисков сердечно-сосудистых заболеваний, метаболического синдрома и гипертонии с использованием IT-технологии. *Вестник Казахского Национального медицинского университета*. 2018; 3: 259-62.
4. Баллюзек М.Ф. Клинические особенности течения метаболического синдрома в пожилом возрасте. *Успехи геронтологии*. 2004; 15: 96-100.
5. Бочарова К.А. Изучение вклада гиперэкспрессии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в патогенез артериальной гипертензии. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2011; 22 (117): 33-6.
6. Гублер, Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина; 1973.
7. Драгунов Д.О., Соколова А.В., Артутюнов Г.П. и др. Взаимосвязь уровня ИЛ-18, ИЛ-6 и уровня потребления натрия у пациентов с гипертонической болезнью и сахарным диабетом. *Кардиология*. 2017; 57(S1): 335-9.
8. Каладзе Н.Н., Крадинова Е.А., Козачков С.П., Мошкова Е.Д. Оптимизация курортного лечения метаболического синдрома у больных геронтологической группы. Опыт санатория «Таврия» (Евпатория). В сборнике: *Инновационные технологии реабилитации: наука и практика. Сборник статей II Международной научной конференции*. 2019; 254-60.
9. Красильников. А.В., Азин А.Л. Метаболический синдром: патогенез и гериатрические аспекты проблемы. *Практическая медицина*. 2011; 6 (54): 31-5.

10. Рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома. Второй пересмотр. *Практическая медицина*. 2010; 5 (44): 81-101.
11. Рыжак Г.А., Желтышева Ж.А. Особенности метаболического синдрома у женщин пожилого возраста с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией. *Успехи геронтологии*. 2012; 25(1): 48-53.
12. Сергеева В.В., Родионова А.Ю., Михайлов А.А., Бобылева Т.А., Паценко М.Б., Лиферов Р.А. Принципы антигипертензивной терапии при метаболическом синдроме. *Клиническая медицина*. 2013; 91(6): 4-8.
13. Шишова С.А., Князева Л.И., Яковенко Л.В. Влияние терапии на маркеры иммунного воспаления и жесткость сосудистого русла у больных артериальной гипертензией с метаболическим синдромом. *Вестник новых медицинских технологий*. 2012; XIX(4): 91-4.
6. Gubler E.V., Genkin A.A. *Application of nonparametric criteria of statistics in biomedical research*. Leningrad: Meditsina; 1973. (in Russian)
7. Dragunov D.O., Sokolova A.V., Artutyunov G.P. et al. Relationship of IL-18, IL-6 level and sodium intake level in patients with hypertension and diabetes mellitus. *Kardiologiya*. 2017; 57(S1): 335-9. (in Russian)
8. Kaladze N.N., Kradinova E.A., Kozachkov S.P., Moshkova E.D. Optimization of resort treatment of metabolic syndrome in patients of gerontological group. the experience of the sanatorium "Tavria" (Evpatoria). *V sbornike: Innovatsionnye tekhnologii reabilitatsii: nauka i praktika. Sbornik statey II Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii*. 2019; 254-60. (in Russian)
9. Krasil'nikov A.V., Azin A.L. Metabolic syndrome: pathogenesis and geriatric aspects of the problem. *Prakticheskaya meditsina*. 2011; 6(54): 31-5. (in Russian)
10. Recommendations of experts of the all-Russian scientific society of cardiologists on the diagnosis and treatment of metabolic syndrome. Second revision. *Prakticheskaya meditsina*. 2010; 44(5): 81-101. (in Russian)
11. Ryzhak G.A., Zheltyшева Zh.A. Features of metabolic syndrome in elderly women with coronary heart disease and arterial hypertension. *Uspekhi gerontologii*. 2012; 25(1): 48-53. (in Russian)
12. Sergeeva V.V., Rodionova A.Yu., Mihaylov A.A., Bobileva T.A., Pacenko M.B., Liferov R.A. Principles of antihypertensive therapy in metabolic syndrome. *Klinicheskaya meditsina*. 2013; 91(6): 4-8. (in Russian)
13. Shishova S.A., Knyazeva L.I., Yakovenko L.V. Effect of therapy on markers of immune inflammation and vascular stiffness in patients with arterial hypertension with metabolic syndrome. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2012; XIX(4): 91-4. (in Russian)
14. Rodriguez-Iturbe B., Pons H., Johnson R.J. Role of the Immune System in Hypertension. *Physiol. Rev.* 2017;97(3): 1127-64.
15. Ribeiro I.S., Pereira I.S., Santos D.P. et al. Association between body composition and inflammation: A central role of IL-17 and IL-10 in diabetic and hypertensive elderly women. *Exp. Gerontol.* 2019; 127: 110734.

REFERENCES

1. Adamenko G.P., Golovko E.S., Skreblo E.I., Tihon T.V. Markers of intravascular inflammation and cytokine profile in arterioles hypertension. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2014; 2: 10-44. (in Russian)
2. Adamenko G.P., Skreblo E.I., Golovko E.S., Tihon T.V. Correlation of laboratory parameters of hemostatic status, cytokine markers with peripheral blood lymphocytosis in arterial hypertension with left stomach myocardial hypertrophy. *Kardiologiya v Belarusi*. 2015; 6(43): 73-83.
3. Amantay A.T., Berdygaliev A.B., Kaynarbaeva M.S. Identification of risks of cardiovascular diseases, metabolic syndrome and hypertension using it-technology. *Vestnik Kazakhskogo Natsional'nogo meditsinskogo universiteta*. 2018; 3: 259-62.
4. Ballyuzek M.F. Clinical features of metabolic syndrome in the elderly. *Uspekhi gerontologii*. 2004; 15: 96-100. (in Russian)
5. Bocharova K.A. Study of the contribution of overexpression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines to the pathogenesis of hypertension. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya*. 2011; 22 (117): 33-6. (in Russian)

Поступила 15.12.19
Принята к печати 15.01.20

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Егорова С. А.¹, Кафтырева Л. А.^{1,2}, Помазанов В. В.³

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *SALMONELLA* К КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫМ АНТИБИОТИКАМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора, 197101, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава РФ, 191015, Санкт-Петербург, Россия;

³ Государственный гуманитарный технологический университет, 142611, г. Орехово-Зуево Московской области, Россия

Бактерии рода Salmonella - одни из ведущих бактериальных возбудителей острых кишечных инфекций, в том числе возникающих в виде групповых заболеваний с пищевым фактором передачи. Сальмонеллёзная инфекция может протекать как гастроэнтерит с развитием осложнений и генерализацией инфекции, нередко регистрируются внекишечные формы, требующие назначения антибактериальной терапии. В настоящее время эффективность многих групп антибиотиков снижена из-за развития резистентности у возбудителя. Национальные системы надзора следят за устойчивостью штаммов Salmonella к антибиотикам «критически важным для медицины» (цефалоспорином расширенного спектра, фторхинолонам), за множественной устойчивостью. Штаммы Salmonella, устойчивые к хинолонам, отнесены Всемирной Организацией Здравоохранения к группе возбудителей с высоким уровнем приоритетности. В статье охарактеризована текущая ситуация по сальмонеллёзам в мире. Обобщены зарубежные и отечественные данные о ведущих сероварах возбудителя, циркулирующих в последние годы в различных регионах мира, показана частота выявления клинически значимой устойчивости в зависимости от серовара Salmonella в странах, где мониторинг проводится на государственном уровне. Описаны молекулярные механизмы резистентности (хромосомные и плазмидные), выявленные у штаммов Salmonella, показана их распространённость у штаммов различных сероваров. Представлена информация об успешных международных полирезистентных клонах Salmonella, имеющих характерные фенотипы и генотипы резистентности, описаны молекулярные методы изучения механизмов резистентности, показана необходимость и значимость микробиологического мониторинга чувствительности к антибиотикам в эпидемиологическом надзоре за сальмонеллёзами.

Ключевые слова: *Salmonella*; чувствительность; резистентность; антимикробные препараты; хинолоны; цефалоспорины расширенного спектра; *gyrA*; БЛРС.

Для цитирования: Егорова С. А., Кафтырева Л. А., Помазанов В. В. Современные тенденции развития устойчивости бактерий рода *Salmonella* к клинически значимым антибиотикам (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 308-315. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-308-315>

Egorova S. A.¹, Kafityreva L. A.^{1,2}, Pomazanov V.V.³

CURRENT TRENDS IN THE DEVELOPMENT OF RESISTANCE TO CLINICALLY SIGNIFICANT ANTIBIOTICS IN *SALMONELLA* (REVIEW OF LITERATURE)

¹Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197101, Saint-Petersburg, Russia;

²State Educational Institution of the Higher Professional Education «North-Western state medical University n.a. I.I. Mechnikov» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 191015, Saint-Petersburg, Russia;

³ State University of Humanities and Technology, 142611, Orekhovo-Zuyevo, Moscow region

Salmonella is one of the leading bacterial pathogens of acute diarrhea as well as foodborne outbreaks. Salmonellosis can occur as gastroenteritis with the development of complications and generalization of infection, also the extra intestinal diseases that require antibiotic therapy are often registered. Currently, the effectiveness of many antibiotics is reduced due to the development of resistance in Salmonella. National Salmonella surveillance systems monitor Salmonella resistance to «critically important for medicine» antibiotics (extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones), as well as multidrug resistance. Quinolone-resistant Salmonella is considered as a high-priority resistant pathogen by the World Health Organization. The article describes the current situation on salmonellosis in the world. Foreign and Russian current data about the leading Salmonella serotypes in different regions of the world are presented. The prevalence of clinically significant resistance depending of the Salmonella serotypes in countries with state monitoring systems is shown. The authors described the leading molecular resistance mechanisms (chromosomal and plasmid mediated) and showed their prevalence in different Salmonella serotypes. The article gives the information about Salmonella successful international multidrug resistant clones with specific resistance phenotypes and genotypes. The authors describe the molecular methods for detection of resistance mechanisms, and show the necessity and significance of antimicrobial susceptibility monitoring in the epidemiological Salmonella surveillance.

Key words: *Salmonella*; susceptibility; resistance; antibiotics; quinolones; extended-spectrum cephalosporins; *gyrA*; ESBL; review.

For citation: Egorova S. A., Kaftyreva L. A., Pomazanov V.V. Current trends in the development of resistance to clinically significant antibiotics in *Salmonella* (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (5): 308-315. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-308-315>

For correspondence: Egorova S.A., PhD, senior researcher of laboratory of enteric infections of Saint-Petersburg Pasteur Institute; e-mail: egorova72@mail.ru

Information about authors:

Egorova Svetlana A., <https://orcid.org/0000-0002-7589-0234>;
Kaftyreva Lidiya A., <https://orcid.org/0000-0003-0989-1404>;
Pomazanov Vladimir V., <https://orcid.org/0000-0002-7336-9912>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 02.03.2020
Accepted 04.03.2020

Бактерии рода *Salmonella* занимают второе место после *Campylobacter* в «рейтинге» возбудителей инфекций общих для человека и животных, ежегодно в странах Евросоюза (ЕС) регистрируют около 100 тыс. случаев сальмонеллёзной инфекции [1]. *Salmonella* лидируют как возбудители групповых заболеваний (вспышек), вызванных употреблением контаминированных пищевых продуктов, которые нередко приобретают масштаб международных. В 2018 г. в странах ЕС около 35,0% этиологически расшифрованных вспышек (более 1500) вызваны бактериями рода *Salmonella*, охватывая максимальное число пострадавших, госпитализированных и умерших лиц [2]. Проблема заболеваемости сальмонеллёзами остается актуальной для Российской Федерации несмотря на снижение уровня заболеваемости (с 35,2 на 100 тыс. населения в 2009 г. до 22,9 в 2018 г.). Сальмонеллёзы занимают третье место (после рота- и норовирусной инфекций) в структуре очагов групповой заболеваемости с фекально-оральным механизмом передачи: в 2018 г. зарегистрировано 83 очага с вовлечением более 2000 человек, из которых около 70% составляли дети [3,4].

Несмотря на широкий спектр выделяемых сероваров, во всех странах ведущим возбудителем сальмонеллёзов являются штаммы *S. enteritidis*, частота выделения других сероваров зависит от региона. Перечень сероваров *Salmonella*, выделяемых от людей согласно данным национальных систем надзора за сальмонеллёзами представлен в табл. 1. В странах ЕС штаммы *S. enteritidis* вызывают до 50% случаев сальмонеллёзов. В перечень часто выделяемых входят серовар *S. typhimurium* и его «монофазный» вариант *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- (13,4 и 8%, соответственно), *S. infantis* (2,3%) [5]. В Канаде к серовару *S. enteritidis* относится каждый четвёртый выделенный штамм, второе-третье место почти с одинаковой частотой делят серовары *S. heidelberg* и *S. typhimurium* (13 и 12% соответственно), четвертое-пятое – *S. newport* и *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- (6 и 5% соответственно) [6]. В США доля серовара *S. enteritidis* значительно ниже (16,8%), около 10% штаммов относятся к сероварам *S. newport* и *S. typhimurium*, около 5% – к *S. javiana* и *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- [7]. Нередко увеличение доли того или иного серовара связано с возникновением вспышек сальмонеллёза. В 2017 г. рост заболеваемости сальмонеллёзом *S. newport* в странах ЕС обусловлен вспышкой в Великобритании

[1], *S. agona* - вспышкой у детей раннего возраста, связанной с употреблением детской молочной смеси [8]. В РФ в этиологической структуре сальмонеллёзов в течение многих лет доминирует серовар *S. enteritidis*, доля которого достигает 70 - 80%. В перечень наиболее часто выделяемых входят серовары *S. typhimurium* и *S. infantis* (2-7% и 5-9%, соответственно), доли штаммов других сероваров редко превышают 1% [3,9].

У штаммов *Salmonella* необходимо определять чувствительность к антимикробным препаратам (АМП) с целью коррекции проводимой терапии, для мониторинга устойчивости в рамках эпидемиологического надзора за сальмонеллёзами. Национальные системы надзора следят за устойчивостью штаммов *Salmonella* прежде всего к АМП, «критически важным для медицины» (цефалоспорином расширенного спектра (ЦРС), фторхинолоном), за множественной устойчивостью к трём и более группам АМП (multi drug resistance, MDR). Данные о клинически значимой устойчивости, выявленной у штаммов *Salmonella* разных сероваров в странах, где мониторинг проводится на государственном уровне, представлены в табл. 2. Данные, полученные для штаммов, выделенных в РФ, приведены в табл. 3. Уровни клинически значимой резистентности варьируют в зависимости от региона и сероваров.

Цефалоспорины расширенного спектра (цефотаксим, цефтриаксон, цефиксим, цефепим) рекомендованы для лечения сальмонеллёзной инфекции у детей и пациентов с тяжёлыми сопутствующими заболеваниями [10]. Несмотря на то, что в целом частота выделения штаммов *Salmonella*, устойчивых к ЦРС, невысока (менее 2% в странах ЕС, около 4% в США, до 8% в Канаде), тем не менее, для некоторых сероваров она значительно превышает средние показатели. В странах ЕС устойчивость к ЦРС наиболее часто выявляют у серовара *S. kentucky* (17,1% штаммов), в США – *S. dublin* (71,4%), *S. infantis* (16,7%), *S. saintpaul* (11,1%), в Канаде – *S. heidelberg* (31%) [6,11-13]. Устойчивость штаммов *Salmonella* к этому классу АМП обусловлена плазмидным механизмом: продукцией б-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и цефалоспоринолаз молекулярного класса С (AmpC). В США у подавляющего числа устойчивых штаммов выявлена продукция цефалоспоринолазы AmpC CMY-2 [13], в странах Европы и Азии преобладали БЛРС ге-

нетического семейства СТХ-М [14-17]. В Корее выделены штаммы, продуцирующие СТХ-М79, СТХ-М15, СМУ-2, при этом с 2010 по 2017 г. доля штаммов, устойчивых к ЦРС, выросла с 0 до 25% [14,15]. В Швейцарии и Иране в 2010-2015 гг. выявлен клон *S. infantis* ST32, штаммы которого продуцировали

СТХ-М65 [16,17]. Штаммы *Salmonella*, продуцирующие б-лактамазы различных генетических семейств, выделяют практически во всех странах от людей, из пищевых продуктов, от сельскохозяйственных животных [18,19]. У единичных штаммов *Salmonella* обнаружены карбапенемазы клинически значимых гене-

Таблица 1

Ведущие серовары *Salmonella*, выделяемые от людей, по данным национальных систем надзора за сальмонеллёзами (%)

Страны Евросоюза [5]		США [7]		Канада [6]		Российская Федерация [3,9]	
Серовары	%	Серовары	%	Серовары	%	Серовары	%
<i>S. enteritidis</i>	49,1	<i>S. enteritidis</i>	16,8	<i>S. enteritidis</i>	24,0	<i>S. enteritidis</i>	74,0-84,0
<i>S. typhimurium</i>	13,4	<i>S. newport</i>	10,1	<i>S. heidelberg</i>	13,0	<i>S. typhimurium</i>	2,0-11,7
<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	8,0	<i>S. typhimurium</i>	9,8	<i>S. typhimurium</i>	12,0	<i>S. infantis</i>	1,3-9,0
<i>S. infantis</i>	2,3	<i>S. javiana</i>	5,8	<i>S. newport</i>	6,0	Другие серовары	7,0-16,0
<i>S. newport</i>	1,2	<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	4,7	<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	5,0		
<i>S. agona, S. derby</i>	0,8	<i>S. infantis</i>	2,7	Другие серовары	40,0		
<i>S. kentucky</i>							
<i>S. stentley, S. java, S. coeln</i>	0,3-0,7	<i>S. muenchen, S. montevideo, S. braenderup</i>	2,6-2,1				
<i>S. virchow, S. chester, S. bareilly, S. naples, S. brandenburg, S. hadar, S. saintpaul, S. kottbus, S. bovismorbificans</i>		<i>S. tomson, S. saintpaul, S. heidelberg, S. oranienburg, S. mississippi</i>	1,7-1,1				
Другие серовары	18,0	<i>S. bareilly, S. berta, S. agona, S. paratyphi B (tartrate+), S. anatum</i>	0,9-0,6				
		Другие серовары	30,8				

Таблица 2

Серовары *Salmonella*, для которых характерна устойчивость к клинически значимым антимикробным препаратам (доля устойчивых штаммов, %)

Страны Евросоюза [11]		США [12,13]		Канада [6]	
Цефалоспорины расширенного спектра					
Всего	1,9	Всего	3,4	Всего	7,8
<i>S. kentucky</i>	17,1	<i>S. dublin</i>	71,4	<i>S. heidelberg</i>	30,1
<i>S. dublin</i>	3,4	<i>S. infantis</i>	16,7	<i>S. newport</i>	7,0
<i>S. infantis</i>	2,6	<i>S. saintpaul</i>	11,1	<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	6,0
<i>S. typhimurium</i>	2,6	<i>S. newport</i>	5,6	<i>S. typhimurium</i>	2,0
<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	2,2	<i>S. typhimurium</i>	5,5	<i>S. enteritidis</i>	0,4
<i>S. enteritidis</i>	0,3	<i>S. heidelberg</i>	2,9		
		<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	1,7		
		<i>S. enteritidis</i>	0,5		
Фторхинолоны					
Всего	13,0	Всего	6,6	Всего	11,7
<i>S. kentucky</i>	92,6	<i>S. dublin</i>	21,4	<i>S. enteritidis</i>	12,0
<i>S. infantis</i>	23,4	<i>S. enteritidis</i>	21,1	<i>S. typhimurium</i>	2,0
<i>S. enteritidis</i>	12,3	<i>S. infantis</i>	20,6	<i>S. heidelberg</i>	1,0
<i>S. typhimurium</i>	8,0	<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	7,4	<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	2,0
<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	6,0	<i>S. hadar</i>	5,3	<i>S. newport</i>	2,0
		<i>S. typhimurium</i>	2,6		
		<i>S. newport</i>	1,6		
Множественная устойчивость к антимикробным препаратам (3 и более классов)					
Всего	28,6	Всего	12,4	Всего	14,4
<i>S. kentucky</i>	76,3	<i>S. dublin</i>	58,3	<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	50,0
<i>S. typhimurium</i>	39,7	<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	67,8	<i>S. typhimurium</i>	29,7
<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	81,4	<i>S. typhimurium</i>	18,3		
<i>S. infantis</i>	39,4	<i>S. infantis</i>	15,3		
<i>S. enteritidis</i>	1,6	<i>S. newport</i>	5,6		
		<i>S. enteritidis</i>	4,2		

Устойчивость к клинически значимым антимикробным препаратам штаммов *Salmonella*, выделенных от людей в Российской Федерации

Серовар (число исследуемых штаммов)	Территория	Годы выделения	Доля устойчивых штаммов, %			Ссылка
			Цефалоспорины расширенного спектра	Налидиксовая кислота	Ципрофлоксацин	
<i>Salmonella</i> spp. (66)	Екатеринбург	1999	1,5	но	0	21
<i>Salmonella</i> spp. (562)	Санкт-Петербург	2003–2005	0,2	6,3	0	22
<i>S. enteritidis</i> (450)			0	5,8	0	
<i>S. enteritidis</i> (64)		2010-2014	18,8	0	0	23
<i>S. typhimurium</i> (22)			45,3	0	0	
<i>Salmonella</i> spp. (746)		2014-2018	1,6	63,3	63,3	30
<i>S. enteritidis</i> (433)	Москва	2005–2008	8,3–14,4	46,9	0,5	24
<i>Salmonella</i> spp. (63)	Пермский край	1987-2009	1,6	но	0	25
<i>S. enteritidis</i> (85)	Дальневосточный	1989-2000	но	но	0	
<i>S. enteritidis</i> (528)	и Сибирский ФО	2003-2008	но	но	53,6	36
<i>S. enteritidis</i> (77)		2011-2016	0-0,4	42,5-59,2	0	26
<i>Salmonella</i> spp. (158)	Казань	2007-2009	0,85	но	0	27
<i>Salmonella</i> spp.	Красноярский край	2015	2,2	но	11,1	28
<i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i> (456)	Смоленск	2012-2017	6-7,0	но	6,3	29

тических семейств: КРС-2 (*S. cubana*, *S. typhimurium*, *S. schwarzengrund*), ОХА-48 (*S. typhimurium*, *S. saint-paul*, *S. kentucky*, *S. paratyphi* В), металло-бета-лактамазы IMP-4 (*S. waycross*, *S. typhimurium*), VIM-1 и VIM -2 (*S. infantis*, *S. kentucky* ST198), NDM-1 (*S. senftenberg*, *S. westhampton*, *S. stanley*, *S. agona*, *S. indiana*, *S. corvallis*), NDM-5 (*Salmonella* 1,4,[5],12:i:-) [20]. Появление устойчивости к карбапенемам у *Salmonella* вероятно связано с диссеминацией детерминант резистентности от госпитальных штаммов *K. pneumoniae* и *E. coli*, которые выделяют не только в стационарах от госпитализированных пациентов, но и во внебольничных условиях.

В РФ по данным разных исследователей устойчивость к ЦРС выявлена у 0-45,3% штаммов *Salmonella* [21-30]. Первые сообщения о выделении штаммов, продуцирующих БЛРС, появились в конце 1990-х годов и относились к серовару *S. typhimurium* клональной линии ST328, штаммы которого циркулировали в РФ, Беларуси, Казахстане [31]. В дальнейшем описаны штаммы других сероваров (*S. virchow*, *S. newport*, *S. enteritidis*, *S. coeln*), продуцирующие БЛРС генетических групп СТХ-М1,-2,-9 и цефалоспориноазу СМУ-2 [22,30].

Фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин и др.) рекомендованы как препараты первого выбора при лечении сальмонеллезной инфекции у взрослых [10]. По суммарным данным устойчивостью к фторхинолонам характеризуются от 7% (США) до 13% (страны ЕС) штаммов *Salmonella*. В США в сероварах *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. infantis* доля устойчивых штаммов в три раза превышала средние показатели [12,13], в странах ЕС практически все штаммы *S. kentucky* (92,6%) устойчивы к фторхинолонам, доля таких штаммов *S. infantis* превышала 20% [11].

Основным механизмом устойчивости к этой группе АМП у штаммов *Salmonella* является модификация мишени (ферментов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV) вследствие приобретения мутаций в хромосомных генах, главным образом *gyrA* и *parC*. У штаммов *Salmonella* с устойчивостью низкого уровня (МПК ципрофлоксацина 0,12-0,5 мг/л) описаны единичные однонуклеотидные замены Ser83Phe, Ser83Tyr, Asp87Asn в гене *gyrA*. Высокоустойчивые штаммы (МПК ципрофлоксацина 1,0 мг/л и выше) имеют, как правило, три однонуклеотидные замены: в гене *gyrA* (Ser83Phe + Asp87Asn) и *parC* (Ser80Ile) [13, 32, 33]. Другие механизмы резистентности, как хромосомные (снижение экспрессии поринов внешней мембраны, повышение экспрессии эффлюксных систем), так и плазмидные (гены *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxAB*), выявлены у *Salmonella* значительно реже и не имеют самостоятельного значения, повышая устойчивость у штаммов с уже имеющимися мутациями в гене *gyrA* [13, 33-35]. Описанные гены входят в состав трансферабельных элементов на плазмидах и нередко локализованы рядом с генами, обуславливающими устойчивость к другим классам АМП (*bla*_{СТХ-М}, *bla*_{СМУ-2}, *bla*_{КРС}, *cat*, *dfrA* и др.).

Исследования, проводимые в РФ, свидетельствуют об актуальности устойчивости *Salmonella* к хинолонам в нашей стране. Многолетний мониторинг в РФ осложнен неоднократными изменениями критериев интерпретации и методических подходов к тестированию этого класса АМП. Для объективного сравнения показателей устойчивости в разные годы следует опираться на данные тестирования налидиксовой кислоты, как индикаторного препарата для детекции ведущего хромосомного механизма устойчивости. В различные годы на территориях РФ устойчивость к хинолонам выявляли у 0-63,3% штаммов [21-30,36].

Штаммы *Salmonella* с множественной устойчивостью к АМП чаще выделяли в странах ЕС (28,6% штаммов), чем в США (12,4%) и Канаде (7,8%). MDR-фенотип характерен для штаммов «монофазного» варианта *S. typhimurium* (50-80%), *S. kentucky* (около 80%), *S. heidelberg*, *S. typhimurium*, *S. infantis* (около 40%) [6,11-13]. В США несмотря на то, что доля серовара *S. dublin* не превышает 1%, большая часть штаммов, выделяемых в последние годы, обладает множественной устойчивостью к АМП (от 60 до 90%), в том числе к ЦРС (66,7%). Ситуация осложняется тем, что сальмонеллёз, вызванный *S. dublin*, более чем у половины пациентов протекает как генерализованная инфекция и требует обязательной антимикробной терапии [13,37].

Обращает на себя внимание появление штаммов *Salmonella*, устойчивых к азитромицину, препарату из класса макролидов, который относительно недавно стали использовать для лечения сальмонеллёзов (2,5% штаммов в странах ЕС, 1,1% в США), к препаратам резерва, используемым для лечения тяжёлых нозокомиальных инфекций - колистину (4,7%) и тигциклину (0,8%) [11,12].

Устойчивость *Salmonella* к АМП во многом обусловлена распространением так называемых «успешных» полирезистентных клонов (генетических линий), характеризующихся определённым фенотипом резистентности и набором генетических детерминант, обеспечивающих этот фенотип. С 1970-х по 2010-е годы в Европе циркулировали полирезистентные штаммы *S. typhimurium* фаготипа 104 (DT104), в конце 2000-х годов зарегистрированы международные вспышки, вызванные «монофазным» вариантом *S. typhimurium* с антигенной формулой 1,4,[5],12:i:- [38,39]. В начале XXI века этот вариант во многих странах вошёл в список сероваров, наиболее часто выделяемых от людей, сельскохозяйственных животных, домашней птицы, кормов и пищевых продуктов [6,11-13].

Большая часть штаммов серовара *S. kentucky*, циркулирующих в мире, являются результатом клональной экспансии одной генетической линии - сиквенс-типа ST198, возникшей около 30 лет назад в Египте путём приобретения хромосомного островка патогенности с генами резистентности к ампицилину, стрептомицину, гентамицину, сульфаметоксазолу, тетрациклину, и многочисленных хромосомных мутаций, обуславливающих устойчивость к хинолонам [40]. В процессе дальнейшей эволюции отдельные линии этого клона приобрели плазмидные детерминанты резистентности к современным АМП: гены БЛРС CTX-M-15 и цефалоспорины SMY-2, карбапенемаз OXA-48 и VIM. Около 80% штаммов *S. kentucky* имеют множественную устойчивость к АМП [11].

Среди штаммов *S. newport* (в последние годы второй-третий по частоте выделения в США серовар) встречаются штаммы с характерным фенотипом множественной устойчивости, продуцирующие цефалоспорины SMY-2, устойчивые к семи классам АМП - так называемый клон *S. newport* MDR-AmpC. В на-

чале 2000-х годов в США такие штаммы составляли до 85% резистентных к ЦРС *Salmonella* [13,41].

В Иране и Швейцарии в последние годы от людей и из мяса кур выделяют штаммы *S. infantis* генетической линии ST32, которая включает как чувствительные штаммы, так и с множественной устойчивостью к АМП, приобретшие различные детерминанты резистентности: хромосомные (мутация Asp87Gly в гене *gyrA*) и плазмидные (гены *bla*_{CTX-M-65} и *mcr-1*) [17,42]. С начала 2000-х г. г. в странах ЕС от людей, кур, из пищевых продуктов выделяют штаммы *S. mbandaka* ST413 с плазмидоопосредованной резистентностью к хинолонам и ЦРС (продуцирующие цефалоспорины SMY-2) [43]. В РФ некоторыми исследователями выявлены единичные штаммы международных полирезистентных клонов *S. newport* MDR-AmpC и *S. kentucky* ST198 [30].

Для выявления штаммов «успешных» клонов *Salmonella* в рамках эпидемиологического надзора за сальмонеллёзами необходимо изучение молекулярных механизмов устойчивости. Наиболее доступными методами являются мультиплексные ПЦР, позволяющие выявить гены, кодирующие б-лактамазы различных генетических семейств (TEM, SHV, OXA, PSE, CMY, KPC, VIM, IMP, NDM, GES и др.) и устойчивость к хинолонам. В РФ разработаны тест-системы для ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс®MDR MBL-FL» и «АмплиСенс®MDR KPC/OXA-48-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) для детекции генов распространённых карбапенемаз у штаммов или в пробах клинического материала. Возможно проведение гибридизации с флуоресцентно-мечеными зондами в формате Luminex или ДНК-чипов. Учитывая разнообразие генов резистентности, возможность сочетания различных механизмов у одного штамма, наиболее полную информацию позволяет получить полногеномное секвенирование (whole genome sequencing, WGS). В свободном доступе представлены биоинформационные платформы для анализа данных WGS, позволяющие выявить известные детерминанты резистентности в полностью или частично собранных геномах: например, Comprehensive Antibiotic Research Database (<http://arpcard.mcmaster.ca>) и ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>).

Мониторинг, проводимый в разных странах, свидетельствует о том, что в популяции *Salmonella* сформировалась устойчивость к АМП, рекомендованным для лечения сальмонеллёзов. В 2017 г. ВОЗ представила перечень «приоритетных возбудителей», устойчивость которых к определённым классам АМП представляет угрозу для здоровья человека. В этом перечне штаммы *Salmonella*, устойчивые к фторхинолонам, отнесены к группе возбудителей с высоким уровнем приоритетности [44]. На всех континентах отмечена циркуляция «успешных» клонов *Salmonella*, штаммы которых устойчивы к этой группе препаратов. В РФ доля устойчивых штаммов среди выделенных от людей, животных, из пищевых продуктов достигает 50-60%.

Широкое использование б-лактамов и хинолонов в сельском хозяйстве способствует диссеминации генов резистентности в штаммах возбудителей об-

щих для человека и животных, к которым относятся *Salmonella*. Локализация генов резистентности к различным классам АМП на одном мобильном элементе делает возможной ко-селекцию штаммов, устойчивых даже к тем препаратам, которые не используются активно в медицине и сельском хозяйстве. Такая «перекрестная» селективная адаптация и горизонтальный перенос генов от штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* вносят свой вклад в появление и распространение устойчивых к АМП штаммов *Salmonella*. Многие АМП выводятся неизменёнными из организма человека и животных, попадают в объекты окружающей среды (вода открытых водоёмов, почва, сточные воды), где служат селективным фактором, способствующим сохранению резистентных микроорганизмов и обмену генетической информацией между бактериями разных видов. Учитывая многокомпонентность проблемы резистентности, которая включает медицинский, ветеринарный, сельскохозяйственный, экологический аспекты, надзор за сальмонеллёзами должен носить интегративный характер и опираться на мониторинг биологических свойств штаммов *Salmonella* (включая серотиповую характеристику, чувствительность, механизмы резистентности к АМП), выделенных из различных источников и экологических ниш.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Salmonellosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2019. Available at: https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2016-salmonellosis.pdf
2. EFSA and ECDC EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 2019; 17(12): 5926, 276 pp.
3. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2019. 254 с. Available at: <https://rosпотребнадзор.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf>
4. Отчёт референс-центра по мониторингу возбудителей острых кишечных инфекций (РЦКИ) за 2017 год. Available at: <http://www.epid-oki.ru/files/reports/rcki/2017-1.pdf>
5. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. 2018; 16(12): 5500.
6. Government of Canada; 2015. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) Annual Report 2013. Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario. Available at: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars/cipars-reports.html>.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National Salmonella Surveillance Annual Report, 2016. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC; 2018. Available at: <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf>.
8. Jourdan-da Silva N., Fabre L., Robinson E., Fournet N., Nisavanh A., Bruyand M. et al. Ongoing nationwide outbreak of *Salmonella* Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017. *Euro Surveillance*. 2018; 23(2): 17-00852.
9. Рожнова С.Ш., Акулова Н.К., Христюхина О.А. Перспективы организации расширенной системы надзора за сальмонеллезами в России. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; 6(85): 28-34.
10. Crump J.A., Sjölund-Karlsson M., Gordon M.A., Parry C.M. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015; 28(4): 901-37.
11. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018. *EFSA Journal*. 2019; 17(2): 5598.
12. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) Now: Human Data. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. Available at: <https://www.cdc.gov/narmsnow>.
13. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Surveillance Report for 2015 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2018. Available at: https://www.cdc.gov/narms/pdf/2015-NARMS-Annual-Report-cleared_508.pdf.
14. Jeon H.Y., Kim Y.B., Lim S.K., Lee Y.J., Seo K.W. Characteristics of cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates from poultry in Korea, 2010-2017. *Poultry Science*. 2019; 98(2): 957-65.
15. Kuang D., Zhang J., Xu X., Shi W., Yang X., Su X. et al. Increase in ceftriaxone resistance and widespread extended-spectrum β -Lactamases Genes Among *Salmonella enterica* from Human and Nonhuman Sources. *Foodborne Pathogen Diseases*. 2018; 15(12): 770-5.
16. Ranjbar R., Ardashiri M., Samadi S., Afshar D. Distribution of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) among *Salmonella* serogroups isolated from pediatric patients. *Iranian Journal of Microbiology*. 2018; 10(5): 294-9.
17. Hindermann D., Gopinath G., Chase H., Negrete F., Althaus D., Zurlfluh K. et al. *Salmonella enterica* serovar Infantis from Food and Human Infections, Switzerland, 2010-2015: Poultry-Related Multidrug Resistant Clones and an Emerging ESBL Producing Clonal Lineage. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8: 1322.
18. Chen C.Y., Hsieh P.H., Chang C.Y., Yang S.T., Chen Y.H., Chang K. et al. Molecular epidemiology of the emerging ceftriaxone resistant non-typhoidal *Salmonella* in southern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2019; 52(2): 289-96.
19. Castellanos L.R., van der Graaf-van Bloois L., Donado-Godoy P., Donado-Godoy P., Leon M., Clavijo V. et al. Genomic Characterization of Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella enterica* in the Colombian Poultry Chain. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9: 2431.
20. Fernández J., Guerra B., Rodicio M.R. Resistance to Carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars from Humans, Animals and Food. *Veterinary sciences*. 2018; 5(2): 40.
21. Ахметова Л.И., Розанова С.М. Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов шигелл и сальмонелл, выделенных в Екатеринбурге. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000; 2(3): 58-62.
22. Egorova S., Kaftyreva L., Grimont P.A.D., Weill F-X. Prevalence and characterization of extended-spectrum cephalosporin resistant non-typhoidal *Salmonella* isolates in adults in St-Petersburg, Russia (2002-2005). *Microbial Drug Resistance*. 2007; 13(2): 102-7.
23. Гончар Н.В., Лазарева И.В., Рычкова С.В., Кветная А.С., Альшаник Л.П., Фомичева Ю.В. и др. Заболеваемость детей сальмонеллезом и уровень резистентности клинических штаммов сальмонелл к антибактериальным препаратам в Санкт-Петербурге. *Журнал инфектологии*. 2015; 7(1): 80-6.
24. Милюткина Л.Н., Гурьева О.В. Эволюция лекарственной резистентности сальмонелл, выделенных от детей, и ее клиническая значимость. *Лаборатория*. 2011; 3: 5-7.

25. Шитова О.И., Казьянин А.В., Захарова Ю.А. Эпидемиологические особенности, биологическая характеристика и чувствительность к антимикробным препаратам сальмонелл, циркулирующих в Пермском крае. *Сибирский медицинский журнал*. 2011; 26(2): 116-20.
26. Кузнецова Н.А., Соловьёва А.С., Раков А.В. Чувствительность к антибиотикам у штаммов *Salmonella Enteritidis*, циркулирующих на территории Сибири и Дальнего Востока, по данным многолетнего мониторинга. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2018; 3: 50-8.
27. Халиуллина С.В., Анохин В.А., Герасимова Е.С., Леонтьева Н.С., Мальшева Л.М., Гутор И.А. Антибиотикорезистентность современных возбудителей внебольничных бактериальных кишечных инфекций у детей. *Практическая медицина*. 2010;1(40):85-8.
28. Решетнева И.Т., Перьянова О.В., Дмитриева Г.М., Остапова Т.С. Антибиотикорезистентность сальмонелл, выделенных на территории Красноярского края. *Гигиена и санитария*. 2015; 94(2): 35-8.
29. Евмененкова И.Г., Мурач Л.В. Анализ резистентности штаммов *Salmonella* spp. к антибиотикам в Смоленском регионе за 2012-2017 гг. *Смоленский медицинский альманах*. 2018; 1: 93-6.
30. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Сужаева Л.В., Забровская А.В., Войтенкова Е.В., Матвеева З.Н. и др. Устойчивость к антимикробным препаратам и клинически значимые механизмы резистентности штаммов *Salmonella*, выделенных в 2014-2018 гг. в Санкт-Петербурге, Россия. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(10): 620-6.
36. Елиусизова А.Б., Шубин Ф.Н., Кузнецова Н.А., Бахолдина С.И. Чувствительность к фторхинолонам сальмонелл в Сибири и на Дальнем Востоке. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010; 4: 51-4.
37. Harvey R.R., Friedman C.R., Crim S.M., Judd M., Barrett K.A., Tolar B. et al. Epidemiology of *Salmonella enterica* Serotype Dublin Infections among Humans, United States, 1968-2013. *Emerging Infectious Diseases*. 2017; 23(9): 1493-1501.
38. Petrovska L., Mather A.E., AbuOun M., Branchu P., Harris S.R., Connor T. et al. Microevolution of Monophasic *Salmonella* Typhimurium during Epidemic, United Kingdom, 2005-2010. *Emerging Infectious Diseases*. 2016; 22(4): 617-24.
39. Gymoese P., Sørensen G., Littrup E., Olsen J.E., Nielsen E.M., Torpdahl M. Investigation of Outbreaks of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Its Monophasic Variants Using Whole-Genome Sequencing, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*. 2017; 23(10): 1631-9.
39. Hawkey J., Le Hello S., Doublet B., Granier S.A., Hendriksen R.S., Fricke W.F. et al. Global phylogenomics of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198. *Microbial Genomics*. 2019; 5(7): e000269.
40. Crim S., Chai S., Reynolds J., Swanson K., Nisler A., Gould H. et al. *Salmonella enterica* serotype Newport infections in the US, 2004-2013: increased incidence investigated through four surveillance systems. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2018; 15(10): 612-20.
41. Ranjbar R., Rahmati H., Shokoohizadeh L. Detection of common clones of *Salmonella enterica* serotype Infantis from human sources in Tehran hospitals. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*. 2018; 11(1): 54-9.
42. Hoszowski A., Zajac M., Lalak A., Przemyski P., Wasyl D. Fifteen years of successful spread of *Salmonella enterica* serovar Mbandaka clone ST413 in Poland and its public health consequences. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2016; 23(2): 237-41.
43. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. News Release 27.02.2017. Available at <http://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
1. European Centre for Disease Prevention and Control. Salmonellosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. Stockholm: ECDC; 2019. Available at: https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AER_for_2016-salmonellosis.pdf
2. EFSA and ECDC EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 2019; 17(12): 5926, 276 pp.
3. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2018: State report. M.: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-Being; 2019. 254p. Available at: <https://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf>. (in Russian)
4. Annually report of the Russian acute intestinal infections reference center (2017). Available at: <http://www.epid-oki.ru/files/reports/rcki/2017-1.pdf>. (in Russian)
5. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. 2018; 16(12): 5500.
6. Government of Canada; 2015. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) Annual Report 2013. Public Health Agency of Canada, Guelph, Ontario. Available at: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/surveillance/canadian-integrated-program-antimicrobial-resistance-surveillance-cipars-reports.html>.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). National *Salmonella* Surveillance Annual Report, 2016. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC; 2018. Available at: <https://www.cdc.gov/national-surveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf>.
8. Jourdan-da Silva N., Fabre L., Robinson E., Fournet N., Nisavanh A., Bruyand M. et al. Ongoing nationwide outbreak of *Salmonella* Agona associated with internationally distributed infant milk products, France, December 2017. *Euro Surveillance*. 2018; 23(2): 17-00852.
9. Rozhnova S.Sh., Akulova N.K., Khristukhina O.A. Prospects for the organization expanded surveillance system for *Salmonella* in Russia. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2015; 6(85): 28-34. (in Russian)
10. Crump J.A., Sjölund-Karlsson M., Gordon M.A., Parry C.M. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015; 28(4): 901-37.
11. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018. *EFSA Journal*. 2019; 17(2): 5598.
12. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) Now: Human Data. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. Available at: <https://www.cdc.gov/narmsgnow>.
13. CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Surveillance Report for 2015 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2018. Available at: https://www.cdc.gov/narms/pdf/2015-NARMS-Annual-Report-cleared_508.pdf.
14. Jeon H.Y., Kim Y.B., Lim S.K., Lee Y.J., Seo K.W. Characteristics of cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates from poultry in Korea, 2010-2017. *Poultry Science*. 2019; 98(2): 957-65.
15. Kuang D., Zhang J., Xu X., Shi W., Yang X., Su X. et al. Increase in ceftriaxone resistance and widespread extended-spectrum β -Lactamases Genes Among *Salmonella enterica* from Human and Nonhuman Sources. *Foodborne Pathogen Diseases*. 2018; 15(12): 770-5.
16. Ranjbar R., Ardashiri M., Samadi S., Afshar D. Distribution of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) among *Salmonella* serogroups isolated from pediatric patients. *Iranian Journal of Microbiology*. 2018; 10(5): 294-9.
17. Hindermann D., Gopinath G., Chase H., Negrete F., Althaus D., Zurfluh K. et al. *Salmonella enterica* serovar Infantis from Food and Human Infections, Switzerland, 2010-2015: Poultry-Related Multidrug Resistant Clones and an Emerging ESBL Producing Clonal Lineage. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8: 1322.

18. Chen C.Y., Hsieh P.H., Chang C.Y., Yang S.T., Chen Y.H., Chang K. et al. Molecular epidemiology of the emerging ceftriaxone resistant non-typhoidal *Salmonella* in southern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2019; 52(2): 289-96.
19. Castellanos L.R., van der Graaf-van Bloois L., Donado-Godoy P., Donado-Godoy P., Leon M., Clavijo V. et al. Genomic Characterization of Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella enterica* in the Colombian Poultry Chain. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9: 2431.
20. Fernández J., Guerra B., Rodicio M.R. Resistance to Carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars from Humans, Animals and Food. *Veterinary sciences*. 2018; 5(2): 40.
21. Akhmetova L.I., Rozanova S.M. Susceptibility to antimicrobials of *Salmonellae* and *Shigellae* isolated in Ekaterinburg. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2000; 2(3): 58-62. (in Russian)
22. Egorova S., Kaftyreva L., Grimont P.A.D, Weill F-X. Prevalence and characterization of extended-spectrum cephalosporin resistant non-typhoidal *Salmonella* isolates in adults in St-Petersburg, Russia (2002-2005). *Microbial Drug Resistance*. 2007; 13(2): 102-7.
23. Gonchar N.V., Lazareva I.V., Rychkova S.V., Kvetnaya A.S., Al'shanik L.P., Fomicheva Yu.V. et al. Salmonellosis in children and antimicrobial resistance of *Salmonella* in Saint-Petersburg. *Zhurnal infektologii*. 2015; 7(1): 80-6. (in Russian)
24. Milyutina L.N., Gur'eva O.V. Evolution of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from children, and its clinical significance. *Laboratoriya*. 2011; 3: 5-7. (in Russian)
25. Shitova O.I., Kaz'yanin A.V., Zakharova Yu.A. Epidemiological features, biological characteristics and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* circulating in the Perm region. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 26(2): 116-20. (in Russian)
26. Kuznetsova N.A., Solovyeva A.C., Rakov A.V. Antibiotic resistance of *Salmonella enteritidis* strains, circulated in territory of the Siberia and Far East, at multi-year monitoring. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2018; 3: 50-8. (in Russian)
27. Khaliullina S.V., Anokhin V.A., Gerasimova E.S., Leont'eva N.S., Malysheva L.M., Gutor I.A. Antimicrobial resistance of modern pathogens of community-acquired bacterial intestinal infections in children. *Prakticheskaya meditsina*. 2010; 1(40): 85-8. (in Russian)
28. Reshetneva I.T., Per'yanova O.V., Dmitrieva G.M., Ostapova T.S. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated in the Krasnoyarsk Territory. *Gigiena i sanitariya*. 2015; 94 (2): 35-8. (in Russian)
29. Evmenenkova I.G., Murach L.V. Analysis of resistance of strains of *salmonella* spp. to antibiotics in the Smolensk region for 2012-2017. *Smolenskiy Meditsinskiy Al'manakh*. 2018; 1: 93-6. (in Russian)
30. Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Suzhaeva L.V., Zabrovskaya A.V., Voitenkova E.V., Matveeva Z.N. et al. Antimicrobial resistance and clinical significant resistance mechanisms of *Salmonella* isolated in 2014-2018 in St. Petersburg, Russia. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2019; 64 (10): 620-6. (in Russian)
31. Kozyreva V.K., Ilina E.N., Malakhova M.V., Carattoli A., Azizov I.S., Tapalski D.V. et al. Long-term dissemination of CTX-M-5-producing hypermutable *Salmonella enterica* serovar typhimurium sequence type 328 strains in Russia, Belarus, and Kazakhstan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58(9): 5202-10.
32. Piddock L.J. Fluoroquinolone resistance in salmonella serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiology Reviews*. 2002; 26: 3-16.
33. Tadesse G., Tessema T.S., Beyene G., Aseffa A. Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistant *Salmonella* in Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2018; 13(2): e0192575.
34. McDermott P.F., Tyson G.H., Kabera C., Chen Y., Li C., Folster J.P. et al. Whole-genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016; 60: 5515-20.
35. Wong M.H., Chan E.W., Liu L.Z., Chen S. PMQR genes *oqxAB* and *aac(6)Ib-cr* accelerate the development of fluoroquinolone resistance in *Salmonella typhimurium*. *Frontiers in Microbiology*. 2014; 5: 521.
36. Eliusizova A.B., Shubin F.N., Kuznetsova N.A., Bakholdina S.I. Fluoroquinolone susceptibility of *Salmonella* in Siberia and the Far East. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2010; 4: 51-4. (in Russian)
37. Harvey R.R., Friedman C.R., Crim S.M., Judd M., Barrett K.A., Tolar B. et al. Epidemiology of *Salmonella enterica* Serotype Dublin Infections among Humans, United States, 1968-2013. *Emerging Infectious Diseases*. 2017; 23(9): 1493-1501.
38. Petrovska L., Mather A.E., AbuOun M., Branchu P., Harris S.R., Connor T. et al. Microevolution of Monophasic *Salmonella Typhimurium* during Epidemic, United Kingdom, 2005-2010. *Emerging Infectious Diseases*. 2016; 22(4): 617-24.
39. Gyomose P., Sorensen G., Littrup E., Olsen J.E., Nielsen E.M., Torpdahl M. Investigation of Outbreaks of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Its Monophasic Variants Using Whole-Genome Sequencing, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*. 2017; 23(10): 1631-9.
40. Hawkey J., Le Hello S., Doublet B., Granier S.A., Hendriksen R.S., Fricke W.F. et al. Global phylogenomics of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198. *Microbial Genomics*. 2019; 5(7): e000269.
41. Crim S., Chai S., Reynolds J., Swanson K., Nisler A., Gould H. et al. *Salmonella enterica* serotype Newport infections in the US, 2004-2013: increased incidence investigated through four surveillance systems. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2018; 15(10): 612-20.
42. Ranjbar R., Rahmati H., Shokoohzadeh L. Detection of common clones of *Salmonella enterica* serotype Infantis from human sources in Tehran hospitals. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*. 2018; 11(1): 54-9.
43. Hoszowski A., Zając M., Lalak A., Przemysk P., Wasyl D. Fifteen years of successful spread of *Salmonella enterica* serovar Mbandaka clone ST413 in Poland and its public health consequences. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2016; 23(2): 237-41.
44. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. News Release 27.02.2017. Available at <http://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

Поступила 02.03.20

Принята к печати 04.03.20

Калимулина К. Р., Исмагуллин Д. Д., Лямин А. В., Кондратенко О. В., Козлов А. В., Жестков А. В.

ПРЕДСТАВИТЕЛИ *MYCOBACTERIUM ABSCESSUS COMPLEX* У ПАЦИЕНТОВ С БРОНХОЛЁГОЧНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ: РАСПРОСТРАНЁННОСТЬ, ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ

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

*Появляется всё больше публикаций, посвящённых повышению распространённости нетуберкулёзных микобактерий (НТМ), в частности, представителей *M. chelonae*/Mycobacterium abscessus complex (MABSc). В работе приведена современная классификация *M. chelonae*/Mycobacterium abscessus complex и его основных представителей. Представлены данные о возможных источниках и путях инфицирования MABSc пациентов, находящихся на стационарном лечении. Указаны особенности культивирования и идентификации с помощью современных методов. Описаны факторы риска развития микобактериозов у пациентов и возможная клиническая картина. Проведена оценка распространённости представителей MABSc в структуре нетуберкулёзных микобактерий, выделенных из клинического материала от 483 пациентов из Самарской области при обследовании на туберкулёз и оценка распространённости от 933 пациентов с муковисцидозом (МВ) из 55 регионов Российской Федерации в период с 2016 по 2019 годы. В первой группе пациентов выделено и идентифицировано 316 штаммов НТМ (65,4%). *M. abscessus* выделено и идентифицировано 10 штаммов и 5 штаммов – *M. chelonae*, что составило 3,2% и 1,6% соответственно от всех НТМ. Представители MABSc выделены у 3,1% обследованных пациентов. В результате скринингового исследования пациентов с МВ выделено и идентифицировано 14194 штаммов микроорганизмов от 933 пациентов. *M. abscessus* изолированы от 14 пациентов разных возрастов. Распространённость MABSc среди обследованных пациентов с МВ в РФ составила 1,5%.*

Ключевые слова: нетуберкулёзные микобактерии; микобактериоз; муковисцидоз.

Для цитирования: Калимулина К.Р., Исмагуллин Д.Д., Лямин А.В., Кондратенко О.В., Козлов А.В., Жестков А.В. Представители *Mycobacterium abscessus complex* у пациентов с бронхолёгочной патологией: распространённость, особенности культивирования и идентификации. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 316-320.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-316-320>

Kalimulina K.R., Ismatullin D.D., Lyamin A.V., Kondratenko O.V., Kozlov A.V., Zhestkov A.V.

MYCOBACTERIUM ABSCESSUS COMPLEX REPRESENTATIVES IN PATIENTS WITH BRONCHOPULMONARY PATHOLOGY: PREVALENCE, PECULIARITIES OF CULTIVATION AND IDENTIFICATION

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

*More and more publications appear in the modern literature on the increase in the prevalence of non-tuberculous mycobacteria (NTMs), in particular, representatives of *M. chelonae* / Mycobacterium abscessus complex (MABSc). The paper presents data on the current classification of *M. chelonae* / Mycobacterium abscessus complex and its main representatives. The main data on the possible sources and ways of infection of MABSc patients in hospital are presented. The main features of cultivation on various nutrient media and their possible identification using modern methods are also indicated. The main risk factors for the development of mycobacteriosis in patients and the possible clinical picture are described. The prevalence of MABSc representatives in the structure of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical material from 483 patients from the Samara region was assessed for examination for tuberculosis, and the prevalence from 933 patients with cystic fibrosis (CF) from 55 regions of the Russian Federation from 2016 to 2019 was estimated. In total, as a result of the study, 316 NTM strains (65.4%) were isolated and identified in the first group of patients. *M. abscessus* was isolated and identified 10 strains and 5 strains - *M. chelonae*, which amounted to 3.2% and 1.6%, respectively, of all NTMs. In general, MABSc representatives were isolated in 3.1% of the examined patients. As a result of a screening study of patients with CF, 14194 microorganism strains from 933 patients were isolated and identified. Altogether *M. abscessus* was isolated and confirmed from 14 patients of different ages. Thus, the prevalence of MABSc among the examined patients with CF in the Russian Federation was 1.5%.*

Key words: nontuberculous mycobacteria; mycobacteriosis; cystic fibrosis.

For citation: Kalimulina K. R., Ismatullin D. D., Lyamin A. V., Kondratenko O. V., Kozlov A. V., Zhestkov A. V. Mycobacterium abscessus complex representatives in patients with bronchopulmonary pathology: prevalence, peculiarities of cultivation and identification. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (5): 316-320 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-316-320>

For correspondence: Ismatullin Danir Damirovich, Assistant, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology; e-mail: danirhalitov@mail.ru

Information about authors:

Kalimulina K.R. <https://orcid.org/0000-0001-5982-3536>

Ismatullin D.D. <https://orcid.org/0000-0002-4283-907X>

Lyamin A.V. <https://orcid.org/0000-0002-5905-1895>

Kondratenko O.V. <https://orcid.org/0000-0002-7750-9468>

Kozlov A.V. <https://orcid.org/0000-0001-9384-6854>

Zhestkov A.V. <https://orcid.org/0000-0002-3960-830X>

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

Acknowledgment. The Charitable Foundation «Ostrova» supported the study.

Received 21.02.2020
Accepted 02.03.2020

Введение. *Mycobacterium abscessus* относится к сапрофитным нетуберкулёзным микобактериям, постоянно находящимся в окружающей среде, преимущественно, в почве и воде. Первое упоминание о ней, в качестве патогена человека, представлено в 1953 г. при исследовании травматически поражённого коленного сустава и близлежащих тканей, откуда и получила свое название за способность вызывать подкожные абсцессы. *M. abscessus* считалась крайне редким возбудителем и лишь изредка упоминалась в публикациях того времени [1]. Через сорок лет появились публикации о роли быстрорастущих микобактерий в заболеваниях лёгких, одно из ключевых мест среди них заняла *M. abscessus* [2]. До 1992 г. *M. abscessus* была объединена в один вид с *Mycobacterium chelonae* - возбудителем, поражающим различные ткани рыб, из-за наличия у этих НТМ одинаковых биохимических свойств, в дальнейшем, с использованием генетических исследований принято решение об их разделении на отдельные виды [3, 4].

По современной классификации *M. abscessus* и *M. chelonae* образуют комплекс быстрорастущих микобактерий MABSc, включающий *M. immunogenum*, *M. salmoniphilum*. Вид *M. abscessus* после проведения генетических исследований разделён на три подвида: *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Особенно важно дифференцировать подвиды *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *massiliense*, имеющие различия в генетических паттернах erm (41) и являющихся ответственным за устойчивость к некоторым препаратам из группы макролидов, которые часто применяют для лечения микобактериальных инфекций, что во многом определяет тактику антимикробной химиотерапии [5]. Представители MABSc обладают широкой резистентностью к противомикробным препаратам. По этой причине необходимо проведение видовой идентификации представителей, входящих в комплекс MABSc.

Несмотря на широкое распространение в медицинской микробиологии классификации НТМ по скорости роста и пигментообразованию, в 2018 г. предложена для обсуждения классификация микобактерий, с разделением их по кладам. В соответствии с ней микобактерии MABSc выделены в отдельную группу *Abscessus-Chelonae* Clade, в состав которой вошли *M. franklini* и *M. saopaulense* [6].

Комплекс MABS включает в себя группу быстрорастущих НТМ, имеющих высокий патогенетический потенциал и участвующих во многих заболеваниях с поражением респираторного тракта, инфекций центральной нервной системы, инфекций кожи и мягких тканей, описаны случаи офтальмологических инфекций и развития бактериемии [7, 8].

Эпидемиология. Практически все изученные НТМ являются обитателями окружающей среды (воды, почва), склонны к образованию биоплёнок. За счёт данно-

го факта и особенностей строения клеточной стенки, содержащей большое количество липидов, микобактерии могут длительно персистировать на объектах внешней среды, в помещениях, связанных с водоснабжением: ванны комнаты, душевые, бассейны [9,10]. В связи с устойчивостью MABSc к некоторым хлорсодержащим дезинфектантам существует определённый риск распространения данной группы микроорганизмов среди госпитализированных и амбулаторных пациентов, а широкое распространение их в природе значительно затрудняет проведение эпидемиологических исследований [11]. В зарубежных публикациях приводятся попытки констатации того факта, что MABSc инфицируют пациентов только при наличии их в окружающей среде, однако появляются работы, в которых исследователи указывают на возможную передачу микобактерий от пациента к пациенту. Отдельной группой риска в данном случае являются пациенты, перенесшие трансплантацию органов [12, 13].

В РФ отсутствуют официальные данные по распространённости MABSc среди пациентов. Увеличение количества пациентов с факторами риска по развитию микобактериозов, в том числе у взрослых пациентов с МВ, широкое внедрение высокотехнологичных методов микробиологической диагностики способствуют увеличению числа случаев выделения MABSc из различных видов клинического материала в качестве этиологического агента инфекций и в форме колонизации слизистых оболочек человека.

Клиническое значение. MABSc являются наиболее распространёнными микроорганизмами из группы быстрорастущих НТМ, вызывающих патологические состояния различной локализации. Высокому риску инфицирования подвержены пациенты с первичными и вторичными иммуносупрессиями различной этиологии; пациенты, получающие глюкокортикостероидную терапию, после трансплантации органов [14, 15]. Среди хронических заболеваний лёгких предрасполагающим факторам к развитию микобактериозов, вызванных MABSc относятся бронхоэктазы, хроническая обструктивная болезнь лёгких, первичная цилиарная дискинезия, аллергический бронхолёгочный аспергиллёз, дефицит α-1-антитрипсина, пневмокоциоз, интерстициальная болезнь лёгких, лёгочный альвеолярный протеиноз, МВ, пациенты с нозологиями, требующими частых хирургических вмешательств [16,17]. Клиническая картина при этом схожа с инфекциями лёгких, вызванных другими микобактериями, симптомы неспецифичны и скрываются под маской хронических инфекций другой этиологии, в том числе туберкулёза [18].

Особенности выделения и идентификации. *M. abscessus* грамположительный неспорообразующий, кислотоустойчивый факультативный анаэроб. Один из распространённых представителей группы быстрорастущих НТМ. Среди MABSc *M. abscessus* является распростра-

нённным видом, имеющим доказанное клиническое значение. При посеве на искусственные питательные среды рост появляется в течение 7 сут после инокуляции. Оптимальная температура роста 28-37° С. Для культивирования чаще всего используются среды для селективного выделения микобактерий: Левенштейн-Йенсена, Финна-П. Для быстрого выявления роста используются жидкие питательные среды, чаще всего Миддлбрук 7Н11 [19]. В связи с особенностями культивирования *M. abscessus* часто ассоциирована с другими быстрорастущими микроорганизмами. Это актуально для пациентов с МВ в связи с тем, что наиболее часто у данных пациентов выделяются *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Achromobacter xylosoxidans* и др. бактерии, плесневые грибы, которые могут существенно влиять на рост и размножение НТМ на плотных селективных средах [20]. Помимо использования селективных сред для повышения частоты выделения *M. abscessus* могут быть использованы методы деконтаминации клинического материала N-ацетил-L-цистеином, гидроксидом натрия или щавелевой кислотой. Имеются данные о возможном негативном влиянии деконтаминации на ростовые свойства и жизнеспособность быстрорастущих НТМ, по этой причине всё чаще обсуждаются вопросы о необходимости разработки методов выделения быстрорастущих микобактерий из клинического материала без его предварительной обработки [21].

При выделении быстрорастущих микобактерий всё чаще используются среды для селективного выделения представителей *Burkholderia cepacia* complex проблемного с эпидемиологической точки зрения микроорганизма для пациентов с МВ. На рынке представлен широкий спектр сред коммерческого производства, таких как селективный агар *Burkholderia cepacia* (BCSA) и селективный агар *Cepacia* компании BioMérieux (Basingstoke, Великобритания, или Nürtingen, Германия). Среда BD Серасия и среда BD OFPBL (окисление/ферментация-полимиксин-бацитрацин-лактоза), в которых бацитрацин и полимиксин В служат ингибиторами сопутствующих бактерий Oxoid Ltd. (Basingstoke, United Kingdom).

На плотных средах *M. abscessus* растут в виде гладких (S-smooth), либо шероховатых (R-rough) колоний [22]. Колонии, характеризующиеся образованием гликопептидолипида, участвуют в образовании биоплёнок и растут в S-форме. Наличие корд-фактора позволяет расти в R-форме колоний. Многие исследования указывают на наименьшую патогенность S-форм колоний НТМ при развитии инфекции у людей, в то время как R-формы колоний обладают большей вирулентностью [23, 24]. Возможно выделение микроорганизмов и в мукоидной форме, данный факт в отношении НТМ недостаточно изучен.

Из методов идентификации MABSc чаще всего используются ДНК-гибридизация и MALDI-ToF масс-спектрометрия, которая позволяет идентифицировать большее количество видов. Доступных методов для идентификации подвидов *M. abscessus* в рутинной практике врачей-бактериологов нет.

Цель исследования – оценка распространённости представителей MABSc среди пациентов с бронхолегочной патологией, возможности выделения их из клинического материала и идентификации с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии.

Материал и методы. Проведена оценка распространённости представителей MABSc в структуре НТМ, вы-

деленных из клинического материала от 483 пациентов из Самарской области при обследовании на туберкулёз (1-я группа) и от 933 пациентов из 55 регионов Российской Федерации с МВ (2-я группа) в период с 2016 по 2019 гг. Исследуемый материал при обследовании на туберкулёз представлен мокротой; от пациентов с МВ – мокротой, мазками с задней стенки глотки, зева и носа.

Выделение микобактерий от пациентов при обследовании на туберкулёз проводилось на средах Левенштейн-Йенсена, Финн П, MGIT. Идентификация выделенных культур проводилась методом ДНК-гибридизации на базе бактериологической лаборатории ГБУЗ «Самарский областной клинический противотуберкулёзный диспансер им. Н. В. Постникова». Посевы инкубировали в соответствии с требованиями приказа Минздрава РФ № 109 «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации». Реидентификация всех выделенных штаммов микроорганизмов проводилась с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии на приборе Microflex LT (Bruker™, Германия). Идентификацию культур проводили методом прямого нанесения и с помощью метода экстракции муравьиной кислотой.

Для выявления MABSc из клинического материала от пациентов с МВ использована селективная среда для выделения *Burkholderia cepacia* с добавкой OFBPL. Время культивирования посевов для выделения MABSc составило 21 день. Первые 7 сут посевы инкубировались при температуре 37° С, с последующим инкубированием в течение 14 сут при температуре 28°С с ежедневным контролем роста микроорганизмов. Все микроорганизмы, выделенные от пациентов с МВ, идентифицированы с использованием MALDI-ToF масс-спектрометра (Bruker™, Германия).

Результаты. В первой группе пациентов выделено и идентифицировано 316 штаммов НТМ от 483 пациентов (65,4%). У остальных пациентов из клинического материала выделены другие виды кислотоустойчивых представителей порядка *Actinomycetales* и другие микроорганизмы. Всего выделено и идентифицировано 10 штаммов *M. abscessus* и 5 штаммов *M. chelonae*, что составило 3,2% и 1,6% соответственно от всех НТМ. Представители MABSc выделены от 3,1% обследованных пациентов. Все штаммы выделены в монокультуре.

1 штамм *M. abscessus* и 3 штамма *M. chelonae* дали рост на плотных и жидких питательных средах, используемых для выделения микобактерий в течение 24-48 часов. Все штаммы, рост которых наблюдался в 1-е сутки культивирования, дали нехарактерные для НТМ мукоидные колонии, окрашенные в жёлто-коричневый цвет. Быстрорастущие штаммы идентифицированы как представители MABSc методом ДНК-гибридизации, что подтверждено MALDI-ToF масс-спектрометрией.

Из штаммов, которые дали характерные для НТМ колонии и рост которых отмечен на 5-7 сут, для 3 культур не удалось получить результаты видовой идентификации с использованием ДНК-гибридизации. При этом получен результат идентификации – микроорганизмы с высоким содержанием G+C (High GC GR+). При реидентификации данных культур методом MALDI-ToF масс-спектрометрии все 3 штамма идентифицированы как *M. abscessus*. Оба штамма *M. chelonae* с типичными культуральными свойствами идентифицированы до вида с использованием обоих методов исследования.

При скрининговом исследовании пациентов с МВ выделено и идентифицировано 14 194 штаммов микроорганизмов от 933 пациентов. Из МABSc выделено 44 штамма *M. abscessus* от 14 пациентов из следующих регионов России: Московская, Ростовская, Пермская, Воронежская, Липецкая, Тюменская, Самарская, Свердловская области, Республика Татарстан, Республика Марий-Эл, Крым. Распространённость МABSc среди обследованных пациентов с МВ в РФ составила 1,5%. Однократный высеv выявлен у 9 пациентов, у одного – трёхкратно, у трёх – пятикратно, одного – семикратно, у одного пациента выделено 10 штаммов *M. abscessus*. Возраст пациентов составил от 1 до 34 лет.

M. abscessus выделялась в ассоциации с другими микроорганизмами. В 25 случаях с *Staphylococcus aureus*, в 8 случаях в ассоциации с *Stenotrophomonas maltophilia*, в 10 случаях с *Pseudomonas aeruginosa*, в 2 случаях с *Burkholderia cepacia group*, в 1 случае с *Aspergillus fumigatu*. В остальных случаях рост получен совместно с нормальной микрофлорой дыхательных путей.

Рост *M. abscessus* на средах регистрировался до 7 сут культивирования у 22 штаммов, от 8 до 14 сут у 11 штаммов, от 15 до 21 у 7 штаммов, от 22 до 30 сут изолировано 4 штамма. Большая часть штаммов дала рост при культивировании более 14 сут на селективных средах для *Burkholderia cepacia complex*. Данный факт необходимо учитывать при работе с материалом от пациентов с МВ. На средах для выделения *Burkholderia cepacia* штаммы *M. abscessus* росли в форме белых пастообразных мелких колоний. В качестве дополнительных сред для культивирования использовались хромогенные среды. При пересеве *M. abscessus* образовывали R- и S-формы колоний голубого, зелёного, сине-белого цвета на хромогенной среде UriSelect4.

Обсуждение. Распространённость представителей МABSc демонстрируют не высокие значения. При обследовании пациентов с бронхолёгочной патологией выделены два вида изучаемого комплекса, общая распространённость которых среди пациентов составила около 3%. При анализе культуральных свойств и результатов идентификации выявлена значительная неоднородность выделенных штаммов. Важно выявление штаммов с атипично быстрым ростом и выделение мукоидных штаммов представителей МABSc. Стандартизированные схемы при обследовании на туберкулёз практически исключают возможность выделения таких изолятов. В случае выделения штаммов *M. abscessus* с типичными культуральными свойствами ДНК-гибридизация не позволила получить 100% результат видовой идентификации, что следует учитывать при исследовании клинического материала от пациентов.

При анализе данных по распространённости МABSc среди пациентов с МВ частота выделения оказалась меньше в два раза, чем среди пациентов с микобактериозами. В отличие от штаммов, выделенных от пациентов 1-й группы, среди пациентов с МВ выделена только *M. abscessus*. Все выделенные штаммы, идентифицированы с использованием MALDI ToF масс-спектрометрии. Культуральные свойства выделенных штаммов отличались значительным разнообразием, особенно по скорости роста, что необходимо учитывать при работе с материалом от пациентов с МВ. Представители МABSc относятся к быстрорастущим НТМ, но значительная часть изолятов выделена позже 7 суток культивирования.

Продемонстрирована возможность использования «обычных» сред для первичного выделения классических микроорганизмов. Использование селективных сред для выделения *Burkholderia cepacia complex* позволяет выделять быстрорастущие НТМ, с получением приемлемых результатов идентификации методом MALDI-ToF масс-спектрометрии.

Заключение. В проведённом исследовании не учитывались факторы риска развития микобактериозов у пациентов, в клиническом материале от которых выделены НТМ. Выявленное значительное разнообразие штаммов принципиально важно с точки зрения разработки методов выделения и идентификации представителей МABSc из клинического материала, что важно, из-за роста распространённости НТМ среди пациентов с бронхолёгочной патологией. Причины такой тенденции связаны с увеличением пациентов с коморбидными состояниями различной этиологии и совершенствованием методов идентификации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Благотворительного фонда «Острова».

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-23 см. REFERENCES)

24. Микробиология и иммунология: учебник. А.А. Воробьёв, ред. 2-е издание, перераб. и доп. М.: Медицина; 2005.

REFERENCES

1. Moore M., Frerichs J.B. An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp. *J. Invest. Dermatol.* 1953; 20(2): 133-69.
2. Griffith D.E., Girard W.M., Wallace R.J. Clinical Features of Pulmonary Disease Caused by Rapidly Growing Mycobacteria: An Analysis of 154 Patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 147: 1271-8.
3. Kubica G.P., Baess I., Gordon R.E., Jenkins P.A., Kwapinski J.B.G., McDermont C. et al. A Co-operative Numerical Analysis of Rapidly Growing Mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1972; 73: 55-70.
4. Kusunoki S., Ezaki T. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. Nov., nom. Rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. abscessus (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1992; 42: 240-5.
5. Nakanaga K., Sekizuka T., Fukano H., Sakakibara Y., Takeuchi F., Wada S. et al. Discrimination of *Mycobacterium abscessus* subsp. massiliense from *Mycobacterium abscessus* subsp. abscessus in clinical isolates by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(1): 251-259. doi: 10.1128/JCM.01327-13.
6. Gupta R.S., Lo B., Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 67. doi: 10.3389/fmicb.2018.00067
7. Griffith D.E., Aksamit T., Brown-Elliott B.A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 175(7): 367-416.
8. Brown-Elliott B.A., Wallace R.J. Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(4): 716-46. doi: 10.1128/cmr.15.4.716-746.2002.
9. Bendinger B., Rijnaarts H.H.M., Altendorf, K., Zehnder, A.J.B. Physicochemical Cell Surface and Adhesive Properties of Coryneform Bacteria Related to the Presence and Chain Length of Mycolic Acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993; 59: 3973-7.
10. McGrath E.E., Blades Z., McCabe, J., Jarry H., Anderson P.B. Nontuberculosis mycobacteria and the lung: From suspicion to treatment. *Lung.* 2010; 188: 269-82.

11. Nessar R., Cambau E., Reytrat J.M., Murray A., Gicquel B. Mycobacterium abscessus: A new antibiotic nightmare. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67: 810-8.
12. Longworth S.A., Vinnard C., Lee I., Sims K.D., Barton T.D., Blumberg E.A. Risk factors for nontuberculous mycobacterial infections in solid organ transplant recipients: a case-control study. *Transpl. Infect. Dis.* 2014; 16: 76-83.
13. Knoll B.M., Kappagoda S., Gill R.R., Goldberg H.J., Boyle K., Baden L.R. et al. Non-tuberculous mycobacterial infection among lung transplant recipients: a 15-year cohort study. *Transpl. Infect. Dis.* 2012; 14: 452-60.
14. Lake M.A., Ambrose L.R., Lipman M.C., Lowe D.M. «Why me, why now?» Using clinical immunology and epidemiology to explain who gets nontuberculous mycobacterial infection. *BMC Med.* 2016; 14: 54. doi: 10.1186/s12916-016-0606-6.
15. Wang P.P., Bray C.A., Lapierre S.G., Soualhine H., Arbour F. Mycobacterium abscessus Lung Infection: A Case Report. *Can. J. Hosp. Pharm.* 2016; 69(3): 238-43.
16. Sfeir M., Walsh M., Rosa R., Aragon L., Liu S.Y., Cleary T. et al. *Mycobacterium abscessus* Complex Infections: A Retrospective Cohort Study. *Open Forum Infect Dis.* 2018; 5(2): ofy022. doi: 10.1093/ofid/ofy022.
17. Hui S.H., Noonan L., Chavada R. Post Liposuction Mycobacterium Abscessus Surgical Site Infection in a Returned Medical tourist Complicated by a Paradoxical Reaction During Treatment. *Infect. Dis. Rep.* 2015; 7(4): 6304. doi: 10.4081/idr.2015.6304.
18. Ryu Y.J., Koh W.J., Daley C.L. Diagnosis and Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Lung Disease: Clinicians' Perspectives. *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)*. 2016; 79(2): 74-84. doi:10.4046/trd.2016.79.2.74.
19. Ravnholt C., Kolpen M., Skov M., Moser C., Katzenstein T.L., Pressler T. et al. The importance of early diagnosis of Mycobacterium abscessus complex in patients with cystic fibrosis. *APMIS*. 2018; 126(12): 885-91. doi:10.1111/apm.12903.
20. Rodríguez-Sevilla G., García-Coca M., Romera-García D., Aguilera-Correa J.J., Mahillo-Fernández I., Esteban J. et al. Non-Tuberculous Mycobacteria multispecies biofilms in cystic fibrosis: development of an in vitro Mycobacterium abscessus and Pseudomonas aeruginosa dual species biofilm model. *Int. J. Microbiol.* 2018; 308(3): 413-23. doi: 10.1016/j.ijmm.2018.03.003.
21. Stephenson D., Perry A., Appleby M.R., Lee D., Davison J., Johnston A., et al. An evaluation of methods for the isolation of nontuberculous mycobacteria from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and patients assessed for lung transplantation. *BMC Pulm Med.* 2019; 19(1): 19. doi:10.1186/s12890-019-0781-2.
22. Jönsson B.E., Gilljam M., Lindblad A., Ridell M., Wold A.E., Weller-Olsson C. Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus, with focus on cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45: 1497-1504. doi:10.1128/JCM.02592-06.
23. Catherinot E., Roux A.L., Macheras E., Hubert D., Matmar M., Dannhoffer L. et al. Acute respiratory failure involving an R variant of Mycobacterium abscessus. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47:271-4. doi:10.1128/JCM.01478-08.
24. Microbiology and immunology: a textbook. [Mikrobiologiya i immunologiya: uchebnik]. Vorob'yov A.A., 2nd ed. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)

Поступила 21.02.20
Принята к печати 02.03.20

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Кушлинский Н.Е.¹, Уткин Д.О.¹, Логинов В.И.², Филиппова Е.А.², Бурдённый А.М.², Кушлинский Д.Н.³, Пронина И.В.², Брага Э.А.²

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГРУППЫ ГЕНОВ МИКРОРНК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава РФ, 115478, Москва, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Министерства науки и высшего образования РФ, 125513, Москва, Россия;

³Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ, 249036, Обнинск, Россия

Установлено, что доля генов микроРНК, инактивируемых за счет метилирования регуляторных CpG-островков в несколько раз выше, чем генов, кодирующих белки, что повышает их привлекательность как перспективных маркеров онкологических заболеваний. Цель данной работы определить роль клиническую значимость метилирования 13 опухолеассоциированных генов микроРНК (MIR-124a-2, MIR-124a-3, MIR-125-B1, MIR-127, MIR-129-2, MIR-132, MIR-137, MIR-203a, MIR-34b/c, MIR-375, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-339) у 26 больных раком яичников. Уровень метилирования оценивали методом метил-специфичной ПЦР в реальном времени. Данные, полученные в первичных опухолях (26), в гистологически неизмененных тканях яичников (15) и в перитонеальных метастазах (19) сопоставляли с применением ряда статистических программ. Для всех 13 генов выявлено нарастание уровня метилирования при переходе от неизменной ткани к первичным опухолям и далее от первичных опухолей к перитонеальным метастазам, причем у генов MIR-203a, MIR-375 и MIR-339 уровень метилирования в метастазах возрастал наиболее существенно (в 2 и более раза). Впервые отмечена корреляция, показывающая согласованность между повышением уровня метилирования в некоторых парах микроРНК, например, MIR-129-2 / MIR-132 ($r_s > 0,7$; $p < 0,0001$), как в первичных опухолях, так и в метастазах. Анализ метилирования генов микроРНК в клинических образцах рака яичников показал связь наблюдаемых молекулярных изменений как с начальными стадиями опухолеобразования, так и с прогрессией и диссеминацией рака яичников, с наличием метастазов в большом сальнике и с появлением асцита. Выявленные зависимости углубляют понимание механизма перитонеального метастазирования и могут быть использованы для отбора новых диагностических и прогностических маркеров рака яичников.

Ключевые слова: рак яичников; метилирование генов микроРНК.

Для цитирования: Кушлинский Н.Е., Уткин Д.О., Логинов В.И., Филиппова Е.А., Бурдённый А.М., Кушлинский Д.Н., Пронина И.В., Брага Э.А. Клиническая значимость метилирования группы генов микроРНК у больных раком яичников. Клиническая лабораторная диагностика. 2020;65 (5): 321-327. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-321-327>

Kushlinskii N.E.¹, Utkin D.O.¹, Loginov V.I.², Filippova E.A.², Burdennyu A.M.², Kushlinsky D.N.³, Pronina I.V.², Braga E.A.²

CLINICAL SIGNIFICANCE OF METHYLATION OF A GROUP OF MIRNA GENES IN OVARIAN CANCER PATIENTS

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478, Russian Federation;

²The Institute of General Pathology and Pathophysiology of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Moscow, 125315, Russian Federation;

³A.F. Tsyb Medical Radiological Scientific Center – branch of the Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Radiology» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, 249036, Russian Federation

It was found that the proportion of microRNA genes inactivated by methylation of regulatory CpG islands is several times higher than the genes encoding proteins, which increases their attractiveness as promising markers of cancer. The aim of this work is to evaluate the clinical significance of methylation of 13 tumor-associated microRNA genes (MIR-124a-2, MIR-124a-3, MIR-125-B1, MIR-127, MIR-129-2, MIR-132, MIR-137, MIR-203a, MIR-34b/c, MIR-375, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-339) in 26 patients with ovarian cancer. Methylation level was evaluated by the method of methylation-specific PCR in real time. The data obtained in primary tumors (26), histologically unchanged ovarian tissues (15) and peritoneal metastases (19) were compared using a number of statistical programs. For all 13 genes, an increase in the level of methylation was revealed during the transition from unchanged tissue to primary tumors and further from primary tumors to peritoneal metastases; moreover, in the genes MIR-203a, MIR-375 and MIR-339, the level of methylation in metastases increased most significantly (in 2 and more times). A correlation was observed for the first time, showing a consistency between the increase in methylation level in some miRNA pairs, for example, MIR-129-2/MIR-132 ($r_s > 0,7$; $p < 0,0001$), both in primary tumors and in metastases. An analysis of microRNA gene methylation in clinical samples of ovarian cancer showed a correlation between the observed molecular changes both with the

initial stages of tumor formation and with the progression and dissemination of ovarian cancer, with the presence of metastases in a large omentum and with the appearance of ascites. The revealed dependencies deepen the understanding of the mechanism of peritoneal metastasis and can be used to select new diagnostic and prognostic markers of ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer; miRNA gene methylation.

For citation: Kushlinskii N.E., Utkin D.O., Loginov V.I., Filippova E.A., Burdennyi A.M., Kushlinsky D.N., Pronina I.V., Braga E.A. Clinical significance of methylation of a group of miRNA genes in patients with ovarian cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65(5): 321-327 (in Russ.). DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-321-327>

For correspondence: Kushlinskii Nikolay Evgenievich, Doctor of Medical Sciences, professor, academician of RAS, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry; e-mail: biochimia@yandex.ru

Information about authors:

Kushlinskii N.E. – <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

Utkin D.O. – <https://orcid.org/0000-0002-6620-2073>

Loginov V.I. – <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Kushlinsky D.N. – <http://orcid.org/0000-0003-1490-8418>

Burdennyi A.M. – <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>

Filippova E.A. – <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>

Pronina I.V. – <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

Braga E.A. – <http://orcid.org/0000-0001-5188-4094>

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

Acknowledgment. The study of the employees of ²Institute of General Pathology and Pathophysiology of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, was supported by the state task on the topic No. 0520-2020-0030 «Research on the role of microRNAs, DNA methylation and reprogramming of the immune system cells in oncogenesis».

Received 11.03.2020
Accepted 18.03.2020

Введение. Метилирование ДНК – эпигенетическая модификация генома, связанная с регуляцией многочисленных процессов в клетке посредством инактивации генов без затрагивания последовательности ДНК. В опухолях наблюдается специфичное гиперметилирование CpG-островков промоторных районов генов-супрессоров опухолевого роста [1]. Метилирование CpG-островков, перекрывающихся с промоторными районами, вовлечено также в подавление экспрессии генов регуляторных микроРНК (miR). Отмечено, что доля генов микроРНК, подверженных метилированию, во много раз больше, чем генов, кодирующих белки [2, 3]. Эта особенность генов микроРНК повышает их привлекательность как перспективных маркеров онкологических заболеваний.

Известно много работ по роли микроРНК и их генов-мишеней в патогенезе и прогрессии рака яичников (РЯ) (см. например, обзоры: 4-6). Однако данные по метилированию генов микроРНК при РЯ ограничены единичными экспериментальными исследованиями [7, 8]; обзорных работ нет.

Материал и методы. Обследовали 26 первичных больных РЯ в возрасте от 27 до 76 лет. У всех пациенток клинический диагноз подтвержден данными гистологического исследования опухоли яичников в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и гистологически верифицирован на основании критериев классификации ВОЗ [9]. У всех больных выявлена серозная аденокарцинома яичников. У 17 пациенток выявлена IIIc стадия РЯ, у 5 – Ia, Ib, Ic, у 1 – IIb, у 2 – IIa, у 1 – IIIa стадия.

Молекулярно-генетические исследования проведены в образцах первичных опухолей у 26 больных РЯ, а также в 15 образцах гистологически неизмененных тканей яичников и в 19 образцах перитонеальных метастазов. При этом, для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70-80%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3-5 мкм), окрашенных гематоксилином-эозином.

Выделение тотальной ДНК. Тотальную ДНК выделяли из образцов ткани яичников по стандартной методике фенол-хлороформной очистки. ДНК хранили при -20°C. Качество и концентрацию ДНК проверяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США).

Анализ метилирования генов микроРНК методом MS-ПЦР с детекцией в реальном времени. Бисульфитную конверсию ДНК проводили, как описано ранее [10], с использованием 0,5-2 мкг ДНК. Модифицированную бисульфитом ДНК хранили при -20°C и использовали в качестве матрицы при проведении количественной MS-ПЦР в реальном времени с использованием набора реактивов «qPCRmix-HS SYBR» и по протоколу фирмы Евроген. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия проведения ПЦР генов микроРНК взяты из работ [11-13]. Амплификацию проводили в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом. Для каждой пары праймеров проверяли отсутствие продукта ПЦР на не конвертированной ДНК. В качестве контролей для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (Promega, США). В качестве позитивного контроля 100%-го метилирования использовали коммерческий препарат ДНК #SD1131 (Thermo Scientific, США).

Статистический анализ клинико-лабораторных данных. В качестве параметра уровня метилирования использовали показатель индекса метилирования (ИМ), который рассчитывался по формуле $ИМ = 100 \times (\text{число метилированных копий гена (M)} / (\text{число метилированных копий гена (M)} + \text{число неметилированных копий гена (U)}))$. ИМ представляет собой непрерывное значение от 0 до 1 и может быть интерпретирован как процент метилирования, при этом ИМ=0 представляет полное отсутствие метилирования и ИМ=1 означает полное метилирование гена [14]. Для каждого парного образца был получен индекс метилирования. Достоверность

полученных различий оценивали в программной среде R с применением непараметрических тестов (U-тест Манна-Уитни, критерий типа Колмогорова-Смирнова). U-тест Манна-Уитни используют для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню количественного признака, что позволяет выявлять различия в значении параметра между малыми выборками. Критерий Колмогорова-Смирнова позволяет проверить гипотезу о том, что данные в двух выборках являются частью одного распределения, и также может применяться для оценки достоверности различий между двумя независимыми выборками, однако, обладает меньшей статистической мощностью, чем U-тест Манна-Уитни. Для всех статистических тестов значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Расчеты проводили в системе для статистического анализа данных SPSS 20.

Выбор основных характеристик и статистических критериев при их сравнении осуществляли после изучения распределения признака и его сравнения с распределением Гаусса по критерию Колмогорова-Смирнова. Для признаков с распределением, значимо отличающимся от нормального, рассчитывали медиану, квартили и применяли непараметрические методы сравнения. Для несвязанных признаков при количестве групп более двух, рассчитывали с применением непараметрического варианта дисперсионного анализа Kruskal-Wallis ANOVA & Median test и Mann-Whitney U test при сопоставлении двух групп. Сравнения связанных значений выполняли с применением непараметрических методов анализа Wilcoxon matched pairs test и Kendall's concordance. Для расчета пороговых значений вычисляли 95% доверительные интервалы показателей. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

При сравнении частот строили таблицы сопряженности признаков. Для расчета p использовали точный критерий Фишера (при небольших объемах групп) и непараметрический критерий χ^2 .

Проводили корреляционный анализ Spearman для непараметрических данных с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости.

Все вычисления проводили на персональном компьютере с помощью математических пакетов «STATISTICA» и SPSS.

Результаты и обсуждение. Повышение уровня метилирования группы генов микроРНК у больных РЯ в первичных опухолях и перитонеальных метастазах. В табл. 1 представлены статистические характеристики метилирования генов микроРНК в опухоли, неизменной ткани яичников и в перитонеальных метастазах РЯ.

Как следует из данных, приведенных в табл. 1, медианы уровня метилирования большинства генов микроРНК в неизменной ткани яичников были значимо ниже, чем в первичной опухоли больных РЯ (за исключением *MIR-132*, *MIR-203a* и *MIR-375*; $p > 0,05$), и чем в ткани метастаза (за исключением *MIR-124a-3*, *MIR-132*, *MIR-203a*, *MIR-375*; $p > 0,05$). Однако медианы уровня метилирования указанных в скобках генов микроРНК в неизменной ткани яичников также были минимальными, а в метастазах – наибольшими.

Проведено сравнение уровней метилирования генов микроРНК в тканях перитонеальных метастазов и первичных опухолей. Показано, что медиана уровня метилирования гена *MIR-203a* в ткани метастазов была значимо выше таковой, чем в опухолях (23,3% против 6,8%; $p = 0,027$). Медиана метилирования гена *MIR-375*

в метастазах также была заметно выше таковой, чем в опухоли (27% против 17%; $p = 0,08$ сильная тенденция к различию), так и по сравнению с образцами неизменной ткани яичников (27% против 11,6%; $p = 0,1$). Выявлено, что медиана уровня метилирования гена *MIR-339* также была заметно выше в метастазах по сравнению с первичными опухолями яичников (27,8% против 11,8%; $p = 0,15$).

При сравнении первичных опухолей с неизменной тканью яичников, наибольшие различия уровня метилирования отмечены для генов *MIR-125b-1* ($p = 0,0008$) и *MIR-34b/c* ($p = 0,0008$). У большинства больных РЯ выявлено многократное превышение уровня метилирования гена *MIR-125b-1* в опухоли по сравнению с неизменной тканью яичников. В то же время, метилирование этой микроРНК в перитонеальных метастазах РЯ могло быть как выше, так и ниже, по сравнению с первичными опухолями яичников. Следует отметить, что среди больных РЯ в 73% (19 из 26) наблюдений были выявлены метастазы, что позволяет предполагать ассоциацию гена *MIR-125b-1* с вовлечением первичной опухоли в процесс диссеминации.

Таким образом, у больных РЯ установлено выраженное повышение уровня метилирования практически у всех 13 исследованных генов микроРНК, как в первичной опухоли, так и в метастазах. В метастазах наблюдали дальнейшее повышение метилирования в сравнении с образцами первичных опухолей в 12 из 13 генов (кроме *MIR-124a-2*), причем у генов *MIR-203a*, *MIR-375* и *MIR-339* уровень метилирования в метастазах возрастал в 2 или более раза. Эти данные указывают на связь метилирования генов *MIR-203a*, *MIR-375* и *MIR-339* не столько с развитием первичных опухолей, сколько с процессами диссеминации РЯ, включая эпителиально-мезенхимальный переход, передвижение метастатических клеток и образование вторичного опухолевого очага.

Ко-метилирование, взаимное влияние метилирования одних микроРНК на другие. Проведен анализ корреляционных зависимостей между уровнями метилирования генов микроРНК в опухоли больных РЯ. В табл. 2 представлены только значимые зависимости.

Так, установлена статистически высоко значимая прямая корреляционная зависимость между уровнями метилирования *MIR-129-2* и *MIR-132* ($r_s = 0,72$; $p < 0,0001$). Она означает, что у большей части больных РЯ высоким значениям уровня метилирования одной из выше указанных микроРНК чаще соответствовали высокие значения другой микроРНК и наоборот. Также довольно тесная статистически высоко значимая линейная зависимость в опухоли больных РЯ выявлена между уровнями метилирования генов *MIR-124a-2* и *MIR-127* ($r_s = 0,71$; $p < 0,0001$).

В ткани метастазов опухоли больных РЯ выявлены тесные прямые зависимости между *MIR-9-1* и *MIR-34b/c* ($r_s = 0,88$; $p < 0,0001$), а также (как и в первичных опухолях яичников) между *MIR-129a* и *MIR-132* ($r_s = 0,81$; $p < 0,0001$).

Не установлено значимой связи между возрастом больных РЯ и уровнями метилирования всех 13 генов микроРНК, определенных в неизменной ткани яичников, опухоли, а также в тканях метастазов.

Связь метилирования генов микроРНК в тканях больных РЯ с клиническими параметрами заболевания. При анализе результатов исследования уровней метилирования генов микроРНК с учетом стадии РЯ па-

Таблица 1

Уровни метилирования (%) генов микроРНК в опухоли, неизменной ткани яичников и в перитонеальных метастазах больных РЯ

МикроРНК (MIR-) p N-T; p N-mts	Ткань опухоли яичников (n=26)		Неизменная ткань яичников (n=16)		Ткань метастазов (n=19)	
	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ	Медиана; квартили	Пределы; 95%ДИ
MIR-124a-2 p=0,002; p=0,01;	45,2; 29,0-94,4	0,2-98,1; 2,0-97,5	6,1; 1,1-10,9	0,2-30,0	44,3; 20,4-84,8	11,7-98,8
MIR-124a-3 p=0,01; p>0,05	17,9; 12,8-32,7	3,8-68,2; 8,5-56,8	4,9; 2,7-13,0	1,9-39,1	21,9; 9,4-37,2	1,7-89,1
MIR-125b-1 p=0,001; p=0,008;	38,6; 12,2-81,1	4,0-99,3; 4,8-96,4	4,6; 1,2-13,2	0,1-23,4	44,4; 13,0-67,5	8,0-91,3
MIR-127 p=0,004; p=0,01;	36,9; 20,3-64,8	0,4-93,3; 1,9-88,4	6,1; 1,2-9,1	1,0-28,2	47,3; 26,7-73,4	8,0-92,4
MIR-129-2 p=0,005; p=0,03;	27,0; 15,2-51,2	2,1-80,6; 3,1-62,7	2,9; 1,3-7,8	1,1-19,0	31,4; 21,5-56,1	2,3-83,8
MIR-132 p>0,05; p>0,05	22,0; 4,9-49,3	0,6-98,5; 0,8-91,5	5,7; 2,4-14,9	0,2-92,8	30,0; 4,6-69,1	0,3-99,8
MIR-137 p=0,005; p=0,015;	17,6; 10,7-32,3	1,0-91,0; 1,3-64,4	3,9; 1,5-10,2	0,3-19,9	23,6; 15,2-47,8	0,4-96,8
MIR-203a p>0,05; p>0,05	6,8; 1,9-17,6	0,7-67,4; 0,8-37,6	3,8; 2,3-6,6	0,4-21,4	23,3; 1,6-65,7	0,1-96,1
MIR-34b/c p=0,002; p=0,008;	12,5; 2,0-18,5	0,1-85,3; 0,2-50,2	1,1; 0,1-2,1	0-28,9	15,3; 11,1-54,0	0,1-93,1
MIR-375 p>0,05; p=0,11	15,9; 10,3-23,3	1,0-43,3; 1,8-35,9	2,8; 0,3-20,7	0,1-97,4	27,0; 8,6-45,1	0,4-69,3
MIR-9-1 p=0,0019; p=0,008;	9,2; 7,6-20,8	0,1-90,8; 0,5-75,6	1,5; 0,3-3,1	0-15,1	11,9; 8,9-44,9	1,4-69,3
MIR-9-3 p=0,0008; p=0,008;	20,6; 8,6-45,1	0,4-90,7; 2,3-59,6	4,0; 2,5-5,6	0,1-13,4	25,8; 9,3-33,4	1,8-91,0
MIR-339 p=0,0008; p=0,008;	11,8; 7,5-32,8	3,8-94,4; 3,9-78,3	3,3; 0,9-5,2	0,5-11,8	27,8; 12,8-51,0	5,8-95,6

Таблица 2

Корреляционные зависимости между метилированием микроРНК в ткани первичной опухоли больных РЯ

микроРНК	r _s	p
MIR-124a-2 – MIR-127	0,71	<0,0001
MIR-124a-2 – MIR-129a-2	0,52	0,007
MIR-124a-2 – MIR-34b/c	0,62	0,0007
MIR-124a-2 – MIR-9-1	0,52	0,006
MIR-124a-3 – MIR-137	0,51	0,008
MIR-125b-1 – MIR-9-3	0,55	0,004
MIR-125b-1 – MIR-339	0,64	0,0004
MIR-127 – MIR-129-2	0,57	0,002
MIR-127 – MIR-339	0,58	0,002
MIR-129-2 – MIR-132	0,72	<0,0001
MIR-137 – MIR-203a	0,51	0,008
MIR-34b/c – MIR-9-1	0,64	0,0004
MIR-375 – MIR-9-1	0,5	0,009
MIR-9-1 – MIR-339	0,59	0,0016

Примечание. r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

циентов объединили в 3 группы: 1-я группа – Ia, Ib, Ic стадии (n=5); 2-я группа – IIa, IIb, IIIa стадии (n=4); 3-я группа – IIIc стадии (n=17).

Провели анализ корреляционных зависимостей между уровнями метилирования 13 генов микроРНК в опухоли и стадией РЯ (табл. 3).

Как следует из данных табл. 3, уровень метилирования 8 генов микроРНК в первичной опухоли (MIR-124a-2, MIR-125b-1, MIR-129-2, MIR-34b/c, MIR-375, MIR-9-1, MIR-9-3, MIR-339) статистически значимо был связан со стадией РЯ прямой корреляционной зависимостью.

Рассчитали статистические характеристики уровня метилирования 13 генов микроРНК у больных РЯ в отношении стадии процесса также методом дисперсионного анализа (табл. 4).

Как следует из данных табл. 4, дисперсионным анализом подтверждено статистически значимое повышение метилирования генов 9 микроРНК в опухоли больных РЯ при увеличении стадии заболевания. При этом можно отметить, что медианы MIR-127 и MIR-9-1 были

Таблица 3

Корреляционные зависимости между уровнем метилирования генов микроРНК в опухоли и стадией РЯ

МикроРНК & Стадия	Опухолевая ткань яичников
<i>MIR-124a-2</i>	$r_s=0,5; p=0,009$
<i>MIR-124a-3</i>	$r_s=-0,05$
<i>MIR-125b-1</i>	$r_s=0,44; p=0,026$
<i>MIR-127</i>	$r_s=0,23$
<i>MIR-129-2</i>	$r_s=0,45; p=0,022$
<i>MIR-132</i>	$r_s=0,09$
<i>MIR-137</i>	$r_s=0,23$
<i>MIR-203a</i>	$r_s=-0,18$
<i>MIR-34b/c</i>	$r_s=0,48; p=0,013$
<i>MIR-375</i>	$r_s=0,43; p=0,027$
<i>MIR-9-1</i>	$r_s=0,49; p=0,01$
<i>MIR-9-3</i>	$r_s=0,5; p=0,009$
<i>MIR-339</i>	$r_s=0,44; p=0,025$

Примечание. r_s – коэффициент корреляции Спирмена.

наибольшими при II и IIIa стадиях и меньше при IIIc стадиях.

Проведен анализ данных исследования уровней метилирования генов микроРНК в группах больных РЯ с отсутствием и наличием метастазов в большом сальнике (у большинства пациенток (94,4%) размеры метастазов в большом сальнике были размером более 2 см).

Следует отметить, что медианы метилирования большинства изученных генов микроРНК в первичной опухоли больных РЯ были выше у пациенток с метастазами в большом сальнике (за исключением *MIR-203a*). Из них 6 микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*) статистически значимо отражали наличие метастазов в большом сальнике, еще 2 микроРНК показали сильную тенденцию к различию медиан (*MIR-125b-1*, *MIR-34b/c*) (см. рисунок).

Ранее было указано, что у 7 больных РЯ метастазы по брюшине не выявлены, а у 19 пациенток обнаружены метастазы по брюшине размерами <1 см ($n=10$) и ≥ 1 см ($n=9$). Рассчитали статистические характеристики метилирования генов микроРНК в первичной опухоли больных РЯ в группах с отсутствием и наличием метастазов по брюшине и их размерами. При этом, только *MIR-132*, исследованный в первичной опухоли больных РЯ, статистически значимо отражал наличие и размеры метастазов опухоли по брюшине.

Следует также отметить сильную тенденцию к различию медиан метилирования генов *MIR-124a-2* и *MIR-129-2*. Аномальны данные для *MIR-125b-1* и *MIR-9-3* с высоким уровнем метилирования в опухолях без метастазов. Все эти особенности требуют подтверждения на расширенных выборках образцов. Такой результат может означать, что в период роста вторичной опухоли от 1 до 2 см уровень метилирования большинства генов микроРНК прекращает нарастать и даже снижается. Иными словами молекулярные характеристики генов микроРНК в период роста вторичной опухоли теряют однонаправленный характер изменений, связанный с процессами метастазирования, – образованием метастатических клеток и их миграцией, вплоть до образования и роста вторичного очага.

Не установлено статистически значимой связи метилирования генов микроРНК в первичной опухоли больных РЯ с наличием асцита. Однако у больных РЯ с обнаружением асцита наибольшее увеличение медианы метилирования отмечено для гена *MIR-124a-2*. Так, если в группе из 10 больных без асцита медиана метилирования гена *MIR-124a-2* равнялась 29,5; 10,9-93,2%, то в группе из 16 пациенток с асцитом была почти в 2 раза выше и составила 56,0; 35,4-94,4% ($p=0,16$).

Таким образом, большинство микроРНК в опухоли больных РЯ значимо отражали стадию заболевания: *MIR-124a-2*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-34b/c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339*. Наличие диссеминации опухолевого процесса у больных РЯ отражали следующие микроРНК: *MIR-124a-2*, *MIR-129-2*, *MIR-375*, *MIR-9-1*, *MIR-9-3*, *MIR-339* (опухолевая ткань яичников). Диссеминацию РЯ по брюшине отражал *MIR-132* (опухолевая ткань яичников).

Изучили связь уровней метилирования генов микроРНК со степенью дифференцировки опухоли – критерий G (табл. 5). В первичных опухолях яичников чаще выявляли высокие уровни метили-

рования генов микроРНК при низкой степени дифференцировки РЯ – G3, однако только *MIR-375* показал статистически значимо различающиеся медианы при умеренной (10,9%) и низкой (21%) степени дифференцировки РЯ. Уровни метилирования генов *MIR-9-1* и *MIR-9-3* также показали тенденцию к различию медиан при учете степени дифференцировки опухоли.

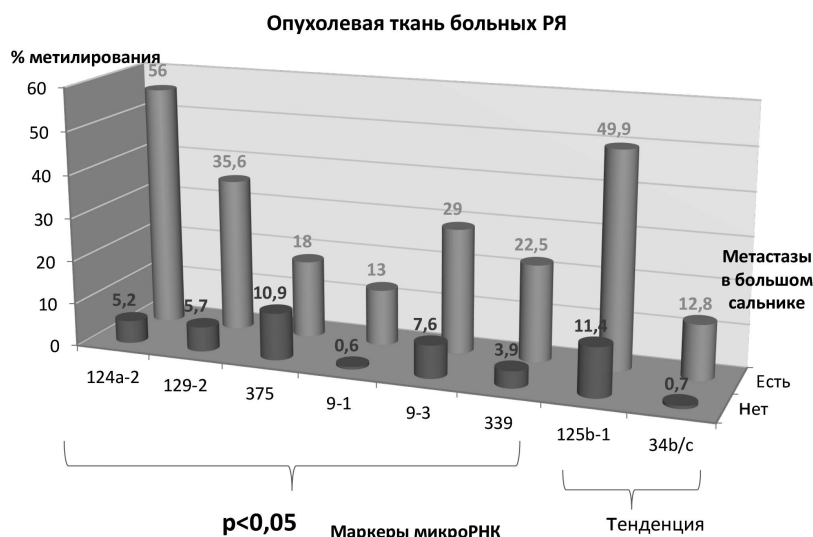
В ткани метастазов, напротив, при G3 степени дифференцировки опухоли чаще выявляли низкие уровни метилирования генов микроРНК. При этом медианы *MIR-124a-3* и *MIR-339* статистически значимо различались, а *MIR-132* показал тенденцию к меньшей медиане.

Заключение. В представленном исследовании изучено метилирование 13 генов микроРНК (*MIR-124a-2*, *MIR-124a-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-127*, *MIR-129-2*, *MIR-132*, *MIR-137*, *MIR-203a*, *MIR-34b/c*, *MIR-375*, *MIR-9-1*,

Таблица 4

Уровни метилирования генов микроРНК в опухоли больных РЯ разных стадий

МикроРНК Ткань опухоли	Обследованные группы			p
	Ia, Ib, Ic (n=5)	IIa, IIb, IIIa (n=4)	IIIc (n=17)	
	Метилирование генов микроРНК (%)			
	Медиана; квартили	Медиана; квартили	Медиана; квартили	
<i>MIR-124a-2</i>	5,0; 2,0-5,2	38,7; 29,5-95,6	56,4; 36,6-94,4	0,004
<i>MIR-124a-3</i>	13,1; 7,2-17,9	27,3; 29,5-31,0	20,2; 12,8-32,7	0,22
<i>MIR-125b-1</i>	8,8; 4,9-11,4	37,7; 23,3-38,6	50,2; 23,1-84,0	0,02
<i>MIR-127</i>	4,8; 3,8-7,9	67,3; 36,4-80,2	37,0; 29,1-61,9	0,014
<i>MIR-129-2</i>	5,6; 3,1-5,7	26,7; 20,3-31,0	36,0; 21,4-51,5	0,036
<i>MIR-132</i>	13,6; 6,3-30,4	16,6; 6,5-36,3	26,9; 3,7-50,0	0,6
<i>MIR-137</i>	7,7; 2,7-9,4	15,7; 14,3-43,6	20,9; 13,5-31,9	0,15
<i>MIR-203a</i>	6,7; 4,0-7,3	20,5; 5,0-35,3	3,3; 1,6-16,6	0,16
<i>MIR-34b/c</i>	0,2; 0,1-1,5	7,7; 0,7-18,1	13,3; 11,3-19,5	0,032
<i>MIR-375</i>	1,8; 1,0-10,9	12,0; 11,0-17,0	18,6; 11,8-26,0	0,06
<i>MIR-9-1</i>	0,6; 0,5-5,6	20,7; 0,6-20,8	13,0; 9,1-21,4	0,007
<i>MIR-9-3</i>	8,6; 2,3-8,7	7,2; 2,7-7,6	38,8; 18,7-50,4	0,045
<i>MIR-339</i>	3,9; 3,8-3,9	21,5; 12,5-26,5	22,5; 7,9-43,8	0,009



Медианы метилирования генов микроРНК в первичной опухоли больных РЯ в зависимости от наличия метастазов в большом сальнике.

Таблица 5

Уровни метилирования генов микроРНК в опухоли и метастазах с учетом степени дифференцировки РЯ

МикроРНК	Метилирование генов микроРНК, % Медиана; квартили					
	Опухолевая ткань яичников			Ткань метастазов		
	G2 (n=11)	G3 (n=13)	p	G2 (n=7)	G3 (n=12)	p
MIR-124a-2	38,7; 5,2-96,4	47,5; 35,8-63,3	>0,05	50,8; 40,2-90,4	33,9; 19,9-66,6	>0,05
MIR-124a-3	20,2; 13,1-40	15,6; 12,8-30,3	>0,05	36,9; 18,5-68,9	13,6; 7,7-32,6	0,045
MIR-125b-1	37,7; 8,8-81,1	49,9; 23,1-82,7	>0,05	44,0; 13,0-85,7	44,4; 11,8-66,3	>0,05
MIR-127	50,4; 4,8-76,4	36,9; 24-51,1	>0,05	46,9; 24,7-74,9	47,3; 26,7-68,6	>0,05
MIR-129-2	27,0; 5,7-51,5	27,0; 18,5-50,2	>0,05	54,8; 28,7-82,9	27,1; 17,8-34,9	>0,05
MIR-132	16,6; 6,5-37,7	36,3; 1,9-50,0	>0,05	63,7; 30,0-71,6	9,1; 1,7-30,2	0,14
MIR-137	14,3; 2,9-43,6	20,9; 16,2-24,9	>0,05	19,3; 8,7-53,9	23,6; 15,2-39,3	>0,05
MIR-203a	6,8; 3,3-20,5	3,3; 1,6-16,6	>0,05	56,3; 2,7-76,3	4,6; 0,5-27,3	>0,05
MIR-34b/c	7,7; 0,7-23,5	12,8; 11,3-16,3	>0,05	20,1; 3,4-54,0	12,9; 11,1-50,3	>0,05
MIR-375	10,9; 3,3-17,0	21,0; 15,9-27,1	0,004	26,9; 4,7-43,2	27,0; 8,8-45,1	>0,05
MIR-9-1	9,1; 0,6-20,7	20,0; 9,1-21,4	0,16	20,1; 8,9-44,9	11,1; 5,6-24,9	>0,05
MIR-9-3	8,7; 17,2-39,7	38,8; 18,4-52,5	0,11	13,5; 9,2-34,4	25,8; 9,3-28,6	>0,05
MIR-339	11,8; 3,9-26,5	22,5; 7,9-32,8	>0,05	45,6; 29,5-56,1	16,7; 8,8-22,8	0,036

Примечание. Статистически значимые достоверности выделены жирным шрифтом.

MIR-9-3, MIR-339), содержащих CpG-островки, в 26 первичных опухолях больных РЯ, в 15 образцах гистологически неизмененных тканей яичников и в 19 образцах перитонеальных метастазов. Для всех 13 генов выявлено нарастание уровня метилирования при переходе от неизменной ткани к первичным опухолям и далее от первичных опухолей к перитонеальным метастазам, причем у генов MIR-203a, MIR-375 и MIR-339 уровень метилирования в метастазах возрастал наиболее существенно – в 2 или более раза. Можно предположить, что метилирование генов MIR-203a, MIR-375 и MIR-339 связано не столько с развитием первичных новообразований, сколько с процессами диссеминации РЯ, включая эпителиально-мезенхимальный переход, передвижение опухолевых клеток и образование вторичного метастатического опухолевого очага. Впервые отмечена корреляция, показывающая согласованность между повы-

шением уровня метилирования для нескольких пар микроРНК. Наиболее значимая согласованность выявлена для двух пар генов: MIR-124-2 / MIR-127 и MIR-129-2 / MIR-132 ($r_s > 0,7$; $p < 0,0001$) в первичных опухолях и еще для ряда пар в метастазах. Ранее участие 13 исследованных микроРНК в патогенезе РЯ было показано, главным образом, в функциональных исследованиях на клеточных культурах [см. например, 15-20]. Однако, анализ метилирования генов микроРНК в клинических образцах РЯ, показывает связь этих молекулярных изменений как с начальными стадиями опухолеобразования, так и с прогрессией и диссеминацией РЯ, с наличием метастазов в большом сальнике и с появлением асцита. Полученные нами результаты углубляют наше понимание механизма перитонеального метастазирования и могут быть использованы для отбора новых диагностических и прогностических маркеров.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование сотрудников ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Министерства науки и высшего образования РФ выполнено при поддержке государственными заданием по теме № 0520-2020-0030 «Исследование роли микроРНК, метилирования ДНК и перепрограммирования клеток иммунной системы в онкогенезе».

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-3, 5-20 см. REFERENCES)

4. Брага Э.А., Фридман М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярные механизмы в метастазировании рака яичников: ключевые гены и регуляторные микроРНК. *Биохимия*. 2017; 82 (5): 717-31.

REFERENCES

1. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2012; 13(7):484-92.
2. Kunej T., Godnic I., Ferdin J., Horvat S., Dovc P., Calin G.A. Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mutat. Res.* 2011; 717(1-2):77-84.
3. Piletic K., Kunej T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch. Toxicol.* 2016; 90(10):2405-19.
4. Braga E.A., Fridman M.V., Kushlinskii N.E. Molecular Mechanisms of Ovarian Carcinoma Metastasis: Key Genes and Regulatory MicroRNAs. *Biokhimiya*. 2017; 82(5):717-3. (in Russian)
5. Deb B., Uddin A., Chakraborty S. miRNAs and ovarian cancer: An overview. *J. Cell. Physiol.* 2018; 233(5):3846-54.
6. Staicu C.E., Predescu D.V., Rusu C.M., Radu B.M., Cretoiu D., Suciu N., Cretoiu S.M., Voinea S.C. Role of microRNAs as Clinical Cancer Biomarkers for Ovarian Cancer: A Short Overview. *Cells*. 2020; 9(1):E169.
7. Schmid G., Notaro S., Reimer D., Abdel-Azim S., Duggan-Peer M., Holly J., Fiegl H. et al. Expression and promotor hypermethylation of miR-34a in the various histological subtypes of ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2016; 16:102.
8. Deng Y., Zhao F., Hui L., Li X., Zhang D., Lin W., Chen Z., Ning Y. Suppressing miR-199a-3p by promoter methylation contributes to tumor aggressiveness and cisplatin resistance of ovarian cancer through promoting DDR1 expression. *J. Ovarian Res.* 2017; 10(1):50.
9. Kurman R.J., Carcangiu M.L., Herrington C.S., Young R.H., eds. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. (4th ed.). Lyon: IARC; 2014.
10. Loginov V.I., Dmitriev A.A., Senchenko V.N., Pronina I.V., Khodyrev D.S., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Gerashchenko

G.V., Chashchina L.I., Kazubskaya T.P., Kondratieva T.T., Lerman M.I., Angeloni D., Braga E.A., Kashuba V.I. Tumor suppressor function of the SEMA3B gene in human lung and renal cancers. *PLoS One*. 2015; 10:e0123369.

11. Braga E.A., Loginov V.I., Burdennyi A.M., Filippova E.A., Pronina I.V., Kurevlev S.V., Kazubskaya T.P., Kushlinsky D.N., Utkin D.O., Ermilova V.D., Kushlinskii N.E. Five Hypermethylated MicroRNA Genes as Potential Markers of Ovarian Cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018; 164(3):351-5.
12. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdennyi A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene*. 2017; 604:1-8.
13. Loginov V.I., Pronina I.V., Burdennyi A.M., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Kushlinsky D.N., Utkin D.O., Khodyrev D.S., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. Novel miRNA genes deregulated by aberrant methylation in ovarian carcinoma are involved in metastasis. *Gene*. 2018; 662:28-36.
14. van Hoesel A.Q., Sato Y., Elashoff D.A., Turner R.R., Giuliano A.E., Shamonki J.M., Kuppen P.J., van de Velde C.J., Hoon D.S. Assessment of DNA methylation status in early stages of breast cancer development. *Br. J. Cancer*. 2013; 108(10):2033-8.
15. Kim Y.W., Kim E.Y., Jeon D., Liu J.L., Kim H.S., Choi J.W., Ahn W.S. Differential microRNA expression signatures and cell type-specific association with Taxol resistance in ovarian cancer cells. *Drug Des. Devel. Ther.* 2014; 8:293-314.
16. Yuan L., Li S., Zhou Q., Wang D., Zou D., Shu J., Huang Y. MiR-124 inhibits invasion and induces apoptosis of ovarian cancer cells by targeting programmed cell death 6. *Oncol. Lett.* 2017; 14(6):7311-7.
17. Bi L., Yang Q., Yuan J., Miao Q., Duan L., Li F., Wang S. MicroRNA-127-3p acts as a tumor suppressor in epithelial ovarian cancer by regulating the BAG5 gene. *Oncol. Rep.* 2016; 36(5):2563-70.
18. Wang J., Ye C., Liu J., Hu Y. UCA1 confers paclitaxel resistance to ovarian cancer through miR-129/ABC1 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018; 501(4):1034-40.
19. Sun J., Cai X., Yung M.M., Zhou W., Li J., Zhang Y. et al. miR-137 mediates the functional link between c-Myc and EZH2 that regulates cisplatin resistance in ovarian cancer. *Oncogene*. 2019; 38(4):564-80.
20. Liu H.Y., Zhang Y.Y., Zhu B.L., Feng F.Z., Zhang H.T., Yan H., Zhou B. MiR-203a-3p regulates the biological behaviors of ovarian cancer cells through mediating the Akt/GSK-3 β /Snail signaling pathway by targeting ATM. *J. Ovarian Res.* 2019; 12(1):60.

Поступила 11.03.20
Принята к печати 18.03.20

Оборин Д.А.¹, Николаева Н.В.², Годовалов А.П.², Карпунина Т.И.²

ЭТИОЛОГИЯ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В ГЕНИТАЛЬНОМ ТРАКТЕ: ПОДОЗРЕНИЯ КЛИНИЦИСТОВ И ПРОБЛЕМЫ ЛАБОРАТОРНОГО ПОДТВЕРЖДЕНИЯ

¹ГКУЗ «Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 614088, г. Пермь, Россия;

²ФГБОУ ВПО «Пермский государственный медицинский университет имени акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, г. Пермь, Россия

Несмотря на многолетнюю историю изучения, лабораторная диагностика гонококковой инфекции остается сложной задачей, не имеющей четко регламентированного эффективного решения. Цель исследования – оценка видового разнообразия микробиоты генитального тракта мужчин и женщин с подозрениями на острую генитальную гонококковую инфекцию (ОГГИ) с использованием тест-систем отечественных производителей. Проведено исследование образцов содержимого уретры 69 мужчин и отделяемого заднего свода влагалища 33 женщин репродуктивного возраста с характерными клиническими проявлениями и предполагаемым диагнозом ОГГИ. Культуральное исследование осуществляли с использованием селективных питательных сред с последующей идентификацией культур по биохимическим свойствам. Обнаружение ДНК *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. выполняли методом ПЦР с помощью наборов Вектор-Бест и ИнтерЛаб Сервис (Россия). Пациенты разделены на группы согласно результатам бактериологического метода и ПЦР. Метагеномное исследование 16S рибосомальной РНК образцов осуществлено на платформе Illumina MiSeq, с использованием набора MiSeq Reagent Kits v3 (600-Cycle Kit). Статистический анализ данных проводили с помощью критерия χ^2 . В результате лабораторного исследования предполагаемый клинический диагноз «ОГГИ» нашёл своё бактериологическое подтверждение лишь в 35,3% случаев, среди которых фрагменты генома *N. gonorrhoeae* детектированы лишь в 63,9% образцов. При этом в метагеномном анализе установлено широкое разнообразие микроорганизмов в генитальном тракте, как мужчин, так и женщин. Данная методика не позволяет оценить жизнеспособность обнаруженных бактерий, спектр микрофлоры избыточно широк, высокий уровень генетического полиморфизма разных штаммов *N. gonorrhoeae* затрудняют интерпретацию полученных результатов. Расшифровать состав микробиоты позволяет использование тест-систем ИнтерЛаб Сервис. Расшифровку этиологии гнойно-воспалительных процессов в генитальном тракте, представляющую серьёзные трудности, в значительной степени облегчает применение отечественных тест-систем для молекулярно-генетического анализа, позволяющих получить необходимую и достаточную для практики информацию.

Ключевые слова: острая генитальная гонококковая инфекция; *Neisseria gonorrhoeae*; микроорганизмы «двойники»; методы амплификации нуклеиновых кислот; генетические маркеры; гнойный уретрит.

Для цитирования: Оборин Д.А., Николаева Н.В., Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Этиология гнойно-воспалительных процессов в генитальном тракте: подозрения клиницистов и проблемы лабораторного подтверждения. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 328-331. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-328-331>

Oborin D.A.¹, Nikolaeva N.V.², Godovalov A.P.², Karpunina T.I.²

ETHIOLOGY OF PURULENT INFLAMMATORY PROCESSES IN THE GENITAL TRACT: SUSPICIONS OF CLINICISTS AND PROBLEMS OF LABORATORY CONFIRMATION

¹Perm Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, 614088, Perm, Russian Federation;

²E.A. Vagner Perm State Medical University, 614990, Perm, Russian Federation

Despite the long history of the study, laboratory diagnosis of gonococcal infection remains a complex task that does not have a clearly regulated effective solution. Aim of investigation was to assess the species diversity of the microbiota of the genital tract of men and women with suspected acute genital gonococcal infection (AGGI) using test systems of Russian manufacturers. A study of samples of the contents of the urethra of 69 men and posterior vaginal fornix fluids of 33 women of reproductive age with characteristic clinical manifestations and a presumptive diagnosis of AGGI was made. Cultivation was carried out using elective culture media with subsequent identification of strains by biochemical properties. Detection of DNA of *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. performed by PCR using Vektor-Best and InterLab Service kits (Russia). All patients were divided into groups according to the results of the bacteriological method and PCR. A metagenomic study of 16S ribosomal RNA samples was performed on the Illumina MiSeq platform using the MiSeq Reagent Kits v3 kit (600-Cycle Kit). Statistical analysis of the data was performed using criterion χ^2 . As a result of a laboratory study, the presumptive clinical diagnosis of «AGGI» found its bacteriological confirmation in 35.3% of cases only, among which fragments of the *N. gonorrhoeae* genome were detected in 63.9% of the samples only. Moreover, a wide variety of microorganisms in the genital tract of both men and women was found in metagenomic analysis. However, this technique does not allow us to assess the viability of the detected bacteria, and the microflora spectrum is excessively wide. In addition, the high level of genetic polymorphism of different strains of *N. gonorrhoeae* complicates the interpretation of the results. Deciphering the composition of microbiota allows the use of InterLab Service kits. The decoding of the etiology of purulent-inflammatory processes in the genital tract, which presents serious difficulties, is greatly facilitated by the use of Russian kits for molecular genetic analysis, which, in our opinion, provides the necessary and sufficient information for practice.

Keywords: acute genital gonococcal infection; *Neisseria gonorrhoeae*; «duplicate» microorganisms; nucleic acid amplification methods; genetic markers; purulent urethritis.

For citation: Oborin D.A., Nikolaeva N.V., Godovalov A.P., Karpunina T.I. Etiology of purulent-inflammatory processes in the genital tract: suspicions of clinicians and problems of laboratory confirmation. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (5): 328-331. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-328-331>

For correspondence: Godovalov A.P., e-mail: AGodovalov@gmail.com

Information about authors:

Godovalov A.P., [http:// orcid.org/0000-0002-5112-2003](http://orcid.org/0000-0002-5112-2003)

Karpunina T.I., [http:// orcid.org/0000-0003-2511-4656](http://orcid.org/0000-0003-2511-4656)

Acknowledgment. The reported study was funded by RFBR and Perm Region according to the research projects 17-44-590404 p_a.

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

Received 14.01.2020
Accepted 21.01.2020

Введение. Заболеваемость инфекциями, передающимися половым путём (ИППП) представляет значимую медико-социальную проблему. Устойчивую тенденцию последних лет к снижению частоты встречаемости в их структуре острой генитальной гонококковой инфекции (ОГГИ) многие исследователи связывают не только с фактическими позитивными изменениями в её эпидемиологии. Авторы обращают внимание на несовершенство требований к микробиологической диагностике ОГГИ, сложность культивирования гонококков, наличие целого ряда микроорганизмов-«двойников», характеризующихся практически идентичными фенотипическими свойствами [1-3]. Модификации биологических свойств и функциональной активности многих микроорганизмов, в частности, гонококков, обусловленные влиянием различных факторов, в том числе антисептиков, антибиотиков, консервантов, ксенобиотиков и других физико-химических параметров, изменением характера межмикробных отношений и иммунной реактивности организма человека [4, 5], затрудняют диагностику ИППП. Всё чаще регистрируются бессимптомные формы и случаи осложнённого течения таких заболеваний, что ведёт к нарушению репродуктивной функции женщин и мужчин [3]. Декларируемое сегодня малосимптомное течение гонококковой инфекции в значительной степени обусловлено некорректно установленной этиологией (негонококковая природа возбудителей), недоучётом складывающихся в микробиоте гениталий межмикробных связей. Это порождает неадекватную антибиотикотерапию и рост антибиотикорезистентности *Neisseria gonorrhoeae*, бактерий-«двойников» – неспецифических возбудителей воспалительных процессов, симбиотических компонентов микрофлоры генитального тракта [2, 6].

Альтернативой традиционной диагностики становятся молекулярно-генетические методы, подтверждающие этиологическую роль *N. gonorrhoeae* лишь в 50-70% случаев положительного бактериологического анализа [7, 8]. Попытки оценить микробное разнообразие при подозрении на ОГГИ с использованием генетических методов весьма немногочисленны [9], хотя на отечественном рынке представлен достаточный ассортимент средств для реализации такого подхода.

Цель исследования – оценка видовой разнообразия микробиоты генитального тракта мужчин и женщин с подозрениями на острую генитальную гонококковую инфекцию с использованием тест-систем отечественных производителей.

Материал и методы. Обследованы 102 пациента (69 мужчин и 33 женщины) репродуктивного возраста с характерными клиническими проявлениями и предполагаемым диагнозом «острая генитальная гонокок-

ковая инфекция». Для исследования получали образцы содержимого уретры и отделяемого заднего свода влагалища. Культуральное исследование осуществляли с использованием селективных питательных сред с последующей идентификацией культур по биохимическим свойствам, в том числе с использованием наборов EN-COCCUStest, STREPTOtest 16 (Lachema, Чехия). Обнаружение ДНК *N. gonorrhoeae* выполняли методом ПЦР с наборами «Реал-бест ДНК *Neisseria gonorrhoeae*» (Россия). Для изучения состава микробиоты использовали тест-системы «АмплиПрайм Флороценоз – Аэробы», «АмплиПрайм – Бактериальный вагиноз» (ИнтерЛаб Сервис, Россия), согласно инструкциям производителей.

При анализе полученных данных пациенты разделены на три группы: в 1-ю включены те, у кого ОГГИ подтверждена в лабораторном исследовании, в том числе в ПЦР, во 2-ю – с положительным бактериологическим анализом (результат ПЦР отрицательный), в 3-ю – у кого предполагаемый диагноз не нашёл лабораторного подтверждения.

Метагеномное исследование 16S рибосомальной РНК образцов осуществлено на платформе Illumina MiSeq, с использованием набора MiSeq Reagent Kits v3 (600-Cycle Kit), согласно рекомендациям производителя. Библиотеки для секвенирования участков V3-V4 гена 16S рибосомной РНК приготовлены согласно 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina. При биоинформационной оценке применено программное обеспечение для метагеномного анализа - Kraken Metagenomics version 2.0.0 (классификатор ридов – коротких нуклеотидных последовательностей), используя стандартную базу данных.

Статистический анализ данных проводили с помощью критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение. В результате лабораторного исследования предполагаемый клинический диагноз «ОГГИ» нашёл бактериологическое подтверждение лишь в 35,3% случаев. Использование набора «Реал-бест ДНК *Neisseria gonorrhoeae*» позволило выявить генетические маркёры возбудителя лишь в 63,9% положительных по бактериологическому методу образцов. Причём «женские» пробы нашли подтверждение результата в ПЦР в половине случаев, «мужские» – в 69,2%. Такая ситуация, очевидно, обусловлена тем, что у мужчин клинические проявления чаще более выражены. У женщин симптоматика как правило, стертая, а сходная клиника зачастую обусловлена разными микроорганизмами. В целом у обследованных пациентов *N. gonorrhoeae* детектированы лишь у 22,5% обследованных (см. таблицу). Сложившаяся ситуация требует рас-

Результаты молекулярно-генетических исследований отделяемого генитального тракта у пациентов с предположительным диагнозом ОГГИ

Микроорганизмы, детектированные при помощи ПЦР-наборов	Предположительный диагноз «ОГГИ», подтвержденный в профильной бактериологической лаборатории		Предположительный диагноз «ОГГИ», не подтвержденный ни в профильной бактериологической лаборатории, ни в ПЦР			
	Мужчины (n=26)	Женщины (n=10)	Мужчины (n=43)	Женщины (n=23)		
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	–	+	–	–	–
<i>Enterobacteriaceae</i>	18	8	4	5	40	17
<i>Staphylococcus</i> spp.	12	6	2	3	19	18
<i>Streptococcus</i> spp.	2	5	0	3	11	15
<i>Lactobacillus</i> spp. <1000	16	5	1	1	15	0
<i>Lactobacillus</i> spp. >1000	2	3	4	4	28	23
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2	2	4	4	18	23
<i>Atopobium vaginae</i>	1	1	5	4	0	2
<i>Enterobacteriaceae</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	10	3	2	1	11	3
<i>Enterobacteriaceae</i> + <i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Streptococcus</i> spp.	2	3	0	2	5	12
<i>Enterobacteriaceae</i> + <i>Streptococcus</i> spp.	0	2	0	1	3	1
<i>G. vaginalis</i> + <i>A. vaginae</i>	0	1	4	4	0	2

шифровки этиологии в остальных случаях, что проще и удобней осуществить с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК). Предложены разные варианты МАНК. В исследовательской работе всё большее внимание привлекают метагеномные исследования 16S рибосомальной РНК в образцах патологического материала. При использовании этого метода установлено широкое разнообразие микроорганизмов в генитальном тракте как мужчин, так и женщин (рисунку, см.обложку). Данная методика не позволяет оценить жизнеспособность обнаруженных бактерий, спектр микрофлоры избыточно широк. При культуральном исследовании более чем в половине случаев микроорганизмы обнаруживали в монокультуре, реже в виде ассоциации двух видов и достаточно редко – трёх видов. В параллельном метагеномном исследовании тех же проб детектированы генетические маркеры существенного количества видов, при этом для большинства из них трудно установить значение в патогенезе инфекционного процесса. На современном этапе развития технологий метагеномного анализа, рекомендовать в диагностическую практику такой подход преждевременно.

В развитии воспалительных заболеваний генитального тракта приобретают актуальность нетипичные, нередко трудно культивируемые, формирующие многокомпонентные ассоциации и, возможно, обуславливающие микст-инфекции, оппортунистические патогены [2]. Учитывая специфику заболевания (путь передачи), происходит взаимное обогащение такими микроорганизмами половых партнеров. Возрастает роль классических возбудителей бактериального вагиноза (БВ) в этиологии гнойного уретрита у мужчин [10]. При бактериологическом исследовании таких признаков ассоциантов микробиоты женщин при БВ, как *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, практически никогда не детектируют в эякуляте мужчин. В нашем исследовании они обнаружены при использовании тест-систем «АмплиПрайм – Бактериальный вагиноз», причём более часто – у мужчин третьей группы (см.таблицу), что может указывать на возможную роль преимущественно «женских» микроорганизмов в развитии уретрита у мужчин, схожего по клиническим симптомам с таковым при ОГГИ. Маскироваться под ОГГИ может неспецифический

воспалительный процесс, обусловленный и другими бактериями (см. таблицу).

Всё чаще на первое место выходят ассоциации бактерий, а участие в них патогенов изучено относительно недостаточно. Рядом авторов показано, что при микст-инфекциях наблюдается более тяжёлое течение заболевания, так как патогенность каждого возбудителя усиливается [2]. В значительной степени расшифровать состав микробных ассоциаций облегчают тест-системы «АмплиПрайм Флороценоз – Аэробы». На основе их применения в настоящем исследовании ассоциации грамположительных кокков и грамотрицательных энтеробактерий чаще обнаруживали при ОГГИ. Такие ассоциации выявлены в первой и второй группах более чем в половине случаев, в третьей – у 26% пациентов ($p < 0,05$). У женщин первой и второй групп в 10 раз чаще встречались ассоциация *G. vaginalis* и *A. vaginae* (80% против 8% в третьей группе; $p < 0,05$). Можно предположить, что микробы-ассоцианты являются необходимым условием для успешной колонизации слизистой *N. gonorrhoeae*, поскольку могут снижать резистентность во входных воротах и повышать персистентные свойства друг друга за счёт деградациии бактериоцинов индигенной микрофлоры и иммунных факторов слизистых оболочек. Присутствие в ассоциации с *N. gonorrhoeae* грамположительных кокков способствует удлинению инкубационного периода, изменению клинической картины, затруднению клинической и лабораторной диагностики [1, 11].

Микроскопический и бактериологический методы дают много сомнительных результатов. Микроскопический метод имеет низкую чувствительность и специфичность (менее 30-40%) при исследовании клинических материалов, полученных от женщин. Выявление *N. gonorrhoeae* регламентировано и в большинстве случаев основано именно на данных бактериоскопического метода, являющегося более дешёвым, чем бактериологический. Но даже те немногие лаборатории, которые используют для выделения *N. gonorrhoeae* культуральный метод, работают с российскими неселективными средами и часто некорректно проводят видовую идентификацию. На ранних стадиях инфекции, в случае её бессимптомного течения чувствительность и специфичность

этих методов может ещё более снижаться, что обусловлено широким спектром микроорганизмов, имеющих схожие фенотипические свойства, особенно при культивировании в микроаэрофильных условиях с избыточным содержанием CO_2 . *N. gonorrhoeae* и *E. faecalis* формируют идентичные мелкие колонии. Энтерококки могут быть грамвариабельными и в ряде случаев давать положительный оксидазный тест как и *N. gonorrhoeae*. При проведении микроскопического исследования лаборатория выдаёт заключение о том, что в клиническом материале обнаружены (или не обнаружены) грамотрицательные диплококки, а не *N. gonorrhoeae*.

Современный метод – метагеномное секвенирование – показывает картину в целом и даёт всеобъемлющую количественную характеристику, в том числе и количество генетического материала человека, что, возможно, отражает остроту процесса и связано с особенностями течения заболевания (см. рисунок на обложке). Такой подход не позволяет установить жизнеспособность и функциональную активность большей части представителей генитальной микробиоты. В силу высокой сложности интерпретации результатов, значительной стоимости таких технологий, требующих высоко квалифицированного персонала в области молекулярно-генетического анализа, их применение в широкой диагностической практике на данном этапе не реализуемо. Применение наборов отечественного производства для ПЦР-РВ с целью расшифровки этиологии гнойно-воспалительных процессов в репродуктивном тракте и мужчин, и женщин представляется оправданным, в том числе и с экономической точки зрения, поскольку менее затратно как в реактивах, так и по времени процедуры, чем бактериологическое исследование.

Заключение. Расшифровка этиологии гнойно-воспалительных процессов в генитальном тракте представляет серьёзные трудности. В значительной степени это обусловлено тем, что для его микробиоты в норме характерно значительное видовое разнообразие, в том числе условно-патогенных бактерий. Во многих странах золотым стандартом диагностики ИППП, в том числе гонококковой инфекции, остается культуральный метод, который характеризуется высокой специфичностью. Его чувствительность отличает многофакторная зависимость как от долабораторного этапа (качества взятия образца, сроков и способов транспортировки проб), так и качества, оптимального спектра используемых питательных сред, условий культивирования и т.п. Современные методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), имеют целый ряд преимуществ, таких как более высокая чувствительность, возможность использования образцов, полученных неинвазивным путём, быстрота, основанная на автоматизации процесса. Секвенирование нуклеиновых кислот позволяет получать независимую от культивирования характеристику микробиоты. МАНК, используемые для диагностики ИППП, имеют существенные ограничения, например, более высокую стоимость, риски контаминации образцов и ингибирования процесса. При диагностике гонореи высокая степень гомологии нуклеотидных последовательностей и частый генетический обмен между гонококками и другими видами рода *Neisseria*, высокий уровень генетического полиморфизма разных штаммов *N. gonorrhoeae* являются причиной неоптимальной специфичности этих технологий. Если пренебречь этими соображениями, интерпретация полу-

чаемых результатов, особенно в отсутствии конкретного патогена, весьма затруднительна в силу широкого микробного разнообразия, детектируемого такими методами. Опыт использования отечественных тест-системы для ПЦР свидетельствует о перспективности их использования как при детекции ДНК *N. gonorrhoeae*, так и для оценки состава сопутствующей микрофлоры, либо анализа симбионтных микроорганизмов в отсутствие специфического патогена.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Пермского края в рамках научного проекта 17-44-590404 p_a.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 3, 5, 6, 9-11
см. REFERENCES)

1. Сингур О.А. Эпидемиологические особенности гонорейной моно- и микст-инфекции в г. Владивостоке. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2011; 104(5): 92-4.
4. Сидоренко С.В., Фриго Н.В., Кухарева Е.Н., Соломка В.С., Буканов Н.А., Полевщикова С.А. Генетическое разнообразие штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, выявленных от больных гонореей из территорий Российской Федерации. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2008; 3: 31-6.
7. Цеслюк М.В., Гушин А.Е., Савочкина Ю.А., Быков А.С., Шипулин Г.А. Сравнение методов лабораторной диагностики *Neisseria gonorrhoeae* с применением «расширенного золотого стандарта». *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 7: 48-53.
8. Щербо С.Н., Тогузov P.T. Современные генетические технологии в лабораторной медицине. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 9: 41.

REFERENCES

1. Singur O.A. Epidemiological features of gonorrheal mono- and mixed infections in Vladivostok. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2011; 104(5): 92-4. (in Russian)
2. Basler M., Shao F. Bacterial infection and symbiosis. *Mol. Biol. Cell*. 2018; 29(6): 683-4.
3. Hill S.A., Masters T.L., Wachter J. Gonorrhea - an evolving disease of the new millennium. *Microb. Cell*. 2016; 3(9): 371-89.
4. Sidorenko S.V., Frigo N.V., Kukhareva E.N., Solomka V.C., Bukkanov N.A., Polevshchikova S.A. Genetic diversity of strains of *Neisseria gonorrhoeae* identified from patients with gonorrhea from the territory of the Russian Federation. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2008; 3: 31-6. (in Russian)
5. Lamont R.J., Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol. Med*. 2015; 21(3): 172-83.
6. Quillin S.J., Seifert H.S. *Neisseria gonorrhoeae* host-adaptation and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol*. 2018; 16(4): 226-40.
7. Tseslyuk M.V., Gushchin A.E., Savochkina Yu.A., Bykov A.S., Shipulin G.A. Comparison of laboratory diagnostic methods for *Neisseria gonorrhoeae* using the «extended gold standard». *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 7: 48-53. (in Russian)
8. Shcherbo S.N., Toguzov R.T. Modern genetic technologies in laboratory medicine. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 9: 41. (in Russian)
9. Diallo K., MacLennan J., Harrison O.B., Msefula C., Sow S.O., Daugla D.M., Johnson E., Trotter C., MacLennan C.A., Parkhill J., Borrow R., Greenwood B.M., Maiden M.C.J. Genomic characterization of novel *Neisseria* species. *Sci Rep*. 2019; 9: 13742.
10. Damke E., Kurscheidt F.A., Irie M.M.T., Gimenes F., Consolaro M.E.L. Male Partners of Infertile Couples With Seminal Positivity for Markers of Bacterial Vaginosis Have Impaired Fertility. *Am. J. Mens Health*. 2018; 12(6): 2104-15.
11. Tommassen J., Arenas J. Biological Functions of the Secretome of *Neisseria meningitidis*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 256.

Поступила 14.01.20

Принята к печати 20.01.20

Добровольская Н. Ю., Прищепина Н. П., Преображенская Е. В., Пчелова Н. Н.

ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЕ КАК ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ПЕРИПРОТЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ ПОСЛЕ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЯ СУСТАВОВ (КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ)

ФГБУ «Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования» Минздрава РФ, 428020, г. Чебоксары, Россия

*Перипротезная инфекция (ППИ) после эндопротезирования крупных суставов является третьей (среди главных причин неудовлетворительных результатов оперативного лечения) серьезной угрозой здоровью пациентов. «Золотым стандартом» диагностики ППИ является культуральное исследование образцов перипротезных тканей и синовиальной жидкости. В 10-30% случаев выделить микроорганизмы невозможно, что объясняется трудностью культивирования и приёмом антибиотиков до взятия проб. Цель работы – демонстрация диагностической ценности ПЦР-диагностики для выявления генетического материала возбудителя культуруотрицательной перипротезной инфекции. Описан клинический случай культуруотрицательной перипротезной инфекции, послужившей причиной повторной двухэтапной ревизии эндопротеза тазобедренного сустава. При первом эпизоде ППИ, возникшем через 3 года после эндопротезирования тазобедренного сустава, бактериологическое исследование пунктата вертельной зоны оперированного сустава выявило метициллин-резистентный *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). Проведено двухэтапное ревизионное эндопротезирование сустава. Через 5 лет после ревизии пациентка госпитализирована с клинико-рентгенологическими признаками ППИ, при исследовании пунктата сустава выявлен характерный для ППИ цитоз. Культуральное исследование пунктата и интраоперационного аспирата на I этапе повторного двухэтапного ревизионного эндопротезирования не выявило аэробных и анаэробных микроорганизмов. В смывах с удалённых компонентов эндопротеза при ПЦР-исследовании обнаружена ДНК метициллин-чувствительного *Staphylococcus aureus* (MSSA), маркер устойчивости (ген *mecA*) не обнаружен. Учитывая сопутствующее онкологическое заболевание, данный результат определил назначение патогенетической антибиотикотерапии, эффективность которой подтвердилась через 8 нед на II этапе ревизии. Проведённое ПЦР-исследование пунктатов сустава и вертельной зоны (до операции), смыва с удалённых компонентов спейсера (после УЗ-обработки) и интраоперационного аспирата из сустава не выявило ДНК *Staphylococcus aureus* и маркера устойчивости (ген *mecA*). Метод ПЦР сделал возможным определить детекцию возбудителя и назначение адекватной антибиотикотерапии при культуруотрицательной перипротезной инфекции.*

Ключевые слова: эндопротезирование суставов; перипротезная инфекция; ревизионное эндопротезирование; антибиотикорезистентность; микробные биоплёнки; полимеразная цепная реакция; ПЦР-диагностика.

Для цитирования: Добровольская Н. Ю., Прищепина Н. П., Преображенская Е. В., Пчелова Н. Н. ПЦР-исследование как вспомогательный метод диагностики перипротезной инфекции после эндопротезирования суставов (клинический случай). Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (5): 332-336. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-332-336>

Dobrovol'skaya N.Yu., Prishchepina N.P., Preobrazhenskaya E.V., Pchelova N.N.

PCR RESEARCH AS AN AUXILIARY METHOD FOR DIAGNOSTICS OF PERIPROTHETIC INFECTION AFTER ENDOPROTHESIS OF JOINTS (CLINICAL CASE)

Federal State Budgetary Institution Federal Center of Traumatology, Orthopedics and endoprosthesis replacement of Ministry of Health of the Russian Federation, 428020, Cheboksary, Chuvash Republic, Russia

*Periprosthetic infection (PPI) after arthroplasty of large joints is the third (among the main causes of unsatisfactory results of surgical treatment) a serious threat to the health of patients. The «gold standard» for the diagnosis of PPI is the bacteriological examination of samples of periprosthetic tissues and synovial fluid. In 10-30% of cases, it is impossible to isolate microorganisms, which is explained by the difficulty of cultivation and taking antibiotics before sampling. The purpose of study is to demonstrate the diagnostic value of PCR diagnostics for identifying the genetic material of an infectious pathogen of a culture-negative periprosthetic infection. Material of the study is a description of a clinical case of a culture-negative periprosthetic infection that caused a second two-stage revision of the hip joint prosthesis. In the first episode of PPI that occurred 3 years after hip replacement, a microbiological examination of the puncture of the trochanteric zone of the operated joint revealed a massive increase in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). A two-stage revision joint replacement was performed. 5 years after the revision, the patient was hospitalized with clinical and radiological signs of PPI, while examining the puncture of the joint revealed characteristic PPI cytolysis. Microbiological examination of punctate and intraoperative aspirate at the first stage of the repeated two-stage revision endoprosthesis replacement did not reveal aerobic and anaerobic microorganisms. In PCR studies, the DNA of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) was detected in washouts from the removed components of the endoprosthesis; no resistance marker (*mecA* gene) was found. Given the concomitant oncological disease, this result determined the appointment of pathogenetic antibiotic therapy, the effectiveness of which was confirmed after 8 weeks at the II stage of revision. The PCR study of joint and trochanteric punctures (before surgery), flushing from the removed spacer components (after ultrasound treatment) and intraoperative aspirate from the joint did not reveal *Staphylococcus aureus* DNA and resistance marker (*mecA* gene). In some cases of periprosthetic infection, traumatologists and orthopedists deal with culturally negative results of a microbiological study of the patient's biomaterial and swabs from the components of endoprostheses in the presence of clinical manifestations of PPI, confirmed by laboratory diagnostics and X-ray examination. According to the literature,*

such clinical situations are observed in 10-30% of cases and are caused by previous antibiotic therapy in the early stages of an infectious complication. After surgical treatment of PPI for the selection of adequate antibiotic therapy, such patients need to at least indirectly determine the type of infection pathogen, which is achieved by the use of additional diagnostic methods, such as a PRC study. In the case described by us, after a course of antibiotic therapy, prescribed according to the results of the first PCR study, the patient's body does not contain DNA traces of the desired infectious agent. Thus, the repeated PCR not only confirmed the accuracy of the initial diagnosis of the source of infection, but also further illustrated the success of the rehabilitation of the periprosthetic infection using a correctly selected antibacterial drug at the previous stage of the study. The use of the PCR method made it possible to diagnose the pathogen and prescribe adequate antibiotic therapy for culture-negative periprosthetic infection.

Key words: joint arthroplasty; periprosthetic infection; revision endoprosthetics; antibiotic resistance; microbial biofilms; polymerase chain reaction; PCR diagnostics.

For citation: Dobrovol'skaya N.Yu., Prishchepa N.P., Preobrazhenskaya E.V., Pchelova N.N. PCR research as an auxiliary method for diagnostics of periprosthetic infection after endostredition of joints (clinical case). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (5): 332-336. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-5-332-336>

For correspondence: Prishchepa N.P., clinical laboratory diagnostics doctor; e-mail: nadya75@yandex.ru

Information about authors:

Dobrovol'skaya N.Yu., <http://orcid.org.0000-0002-8786-4316>

Prishchepa N.P., <http://orcid.org.0000-0002-5763-0711>

Preobrazhenskaya E.V., <http://orcid.org.0000-0003-3556-145X>

Pchelova N.N., <http://orcid.org.0000-0001-9507-9118>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Received 22.01.2020
Accepted 27.01.2020

Введение. Перипротезная инфекция (ППИ) – глубокая инфекция области хирургического вмешательства, развившаяся после имплантации эндопротеза. По данным Российского регистра эндопротезирования тазобедренного сустава РНИИТО им. Р.Р. Вредена, данная патология занимает первое место среди причин ранних ревизий [1]. Несмотря на относительно невысокую частоту ППИ после первичного эндопротезирования (0,3-2,2%), в случаях повторных (ревизионных) операций риск развития ППИ возрастает в несколько раз, достигая 5,9-13,6% [1-3]. Частота рецидивов при лечении существующей ППИ составляет 23,2-31,5% [4]. ППИ является третьей (среди главных причин неудовлетворительных результатов оперативного лечения) серьёзной угрозой здоровью пациентов и составляет значительную долю расходов учреждений здравоохранения [5]. Вероятность развития ППИ повышают различные факторы риска и сопутствующие заболевания – такие, как ревматоидный артрит, предшествующие операции на тазобедренном суставе, ожирение, нарушение свертываемости крови, дооперационная анемия, сахарный диабет, иммуносупрессия [6,7].

Взгляды на лабораторную диагностику ППИ неоднозначны: существуют американская и европейская школы [8,9]. Врачами-травматологами-ортопедами используются критерии диагностики ППИ, принятые на согласительной конференции (Консенсус) по ППИ [8]. При диагностике ППИ принимаются во внимание и другие критерии [9].

«Золотым стандартом» диагностики ППИ является культуральное исследование образцов перипротезных тканей и синовиальной жидкости на аэробы и анаэробы, подсчёт клеток с лейкоцитарной формулой. Уровень лейкоцитов, позволяющий заподозрить инфекционный процесс, при наличии протеза коленного сустава составляет более 1700 клеток/мкл [9,10]. Проводились исследования в отношении пациентов после эндопротезирования тазобедренного сустава, цитоз при подтверждённых ППИ составил более 3000 клеток/мкл [8].

Ведущими возбудителями ППИ являются *Staphylococcus aureus* и *S. epidermidis* [11,12]. Частыми возбудителями ППИ являются коагулазонегативные стафилококки (30-43%), *S. aureus* (12-23%), микробные ассоциации (10-20%), грамотрицательные бактерии (10-17%), стрептококки (9-10%), энтерококки (3-7%), анаэробы (2-4%), *Candida spp.* (1-3%) [13].

Ведущая роль *S. aureus* и *S. epidermidis* в этиологии ортопедической инфекции обусловлена их способностью формировать микробные биоплёнки на поверхности искусственных имплантатов [14,15]. Существование возбудителей в составе биоплёнок затрудняет диагностику ППИ и снижает эффективность антибактериальной терапии [16]. Использование эффективного метода ультразвуковой (УЗ) обработки удалённых компонентов эндопротеза позволило значительно повысить диагностическую значимость культурального исследования, в ряде случаев, ранее идентифицируемых как асептическое расшатывание эндопротеза, диагностирована ППИ. Обработка УЗ удалённых компонентов эндопротеза ведёт к деструкции ассоциированной с имплантатом микробной биоплёнки, обеспечивая возможность эффективного культурального исследования, что не представляется возможным при анализе аспирата или интраоперационных образцов тканей. Культивирование жидкости после УЗ обработки компонентов эндопротеза даёт количественную оценку микробной обсеменённости и повышает чувствительность культурального метода [16,17], особенно, если пациенты получали антибиотики до операции. Чувствительность и специфичность для перипротезной ткани составляют 76% и 93% соответственно, чувствительность и специфичность жидкости после УЗ обработки – 95% и 97% соответственно [17]. В 10-30% случаев ППИ выделить микроорганизмы невозможно [13], что связано с трудностью культивирования и приёмом антибиотиков до взятия проб.

ПЦР может быть использована для наблюдения за пациентами с подозреваемой ППИ и пациентами с историей приёма антибиотиков. ПЦР может дать ценную

дополнительную диагностическую возможность для обнаружения некультивируемых микроорганизмов в культууроотрицательных клинических образцах. ПЦР обеспечивает детекцию микроорганизма в исследуемом биоматериале в течение 5 час, что даёт возможность раннего начала антибиотикотерапии [18-21]. В случае развития ППИ врач ограничен во времени, и при получении культууроотрицательного результата ожидает от ПЦР указания на вид микроорганизма, причастного к развитию процесса, для своевременного назначения этиотропной антибиотикотерапии во избежание возможного прогрессирования инфекции. ПЦР даёт положительный результат и в случае гибели патогена при антибиотикотерапии, поскольку для элиминации ДНК требуется время. ПЦР детектирует ДНК или РНК возбудителя, не отличая при этом мёртвые клетки от живых. Неспособность ПЦР различать мертвые и живые патогены налагает определённые требования при использовании ПЦР для контроля эффективности лечения. Основное правило – дождаться полного выведения фрагментов инфекционного агента из организма. По истечении 4-8 нед после завершения антибиотикотерапии метод ПЦР можно использовать для контроля эффективности проведённого лечения.

Цель исследования – демонстрация диагностической ценности ПЦР-диагностики для выявления генетического материала возбудителя культууроотрицательной перипротезной инфекции после эндопротезирования тазобедренного сустава.

Материал и методы. Представлено клиническое наблюдение диагностики ППИ у женщины, 66 лет, с эндопротезом тазобедренного сустава (ТБС). Использовались клинические, лабораторные (лейкоциты, гемоглобин, СОЭ, СРБ, пресепсин, прокальцитонин, креатинин крови, скорость клубочковой фильтрации), рентгенологический методы диагностики. Для прицельной навигации и корректной аспирации содержимого суставов использовался переносной УЗ-сканер Philips Spark (США) с конвексным датчиком – 2-6 МГц и линейный датчик 4-12 МГц. Биоптаты окрашивали по Граму. ПЦР-исследования выполнялись на приборе Rotor-Gene Q (QIAGEN Германия) наборами для выделения ДНК – «Рибо-преп» (Россия), для амплификации и детекции – «АмплиСенс MRSA – скрин-титр-FL» (Россия) по стандартной методике. Последний предназначен для выявления и количественного определения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *S. aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* Метициллин-резистентность подтверждается выявлением гена *mecA*. Аналитическая чувствительность метода – 400 копий/мл.

Результаты. Пациентка впервые обратилась в Федеральный центр травматологии, ортопедии и эндопротезирования (далее – Центр) в июле 2014 г. (через 3 года после первичного тотального эндопротезирования (ТЭП) левого ТБС в другом ЛПУ по поводу чрезвертельного перелома левого бедра в результате травмы в 2011 г. и через 4 мес после экстирпации матки с жалобами на боли и дискомфорт в левом ТБС, периодическую лихорадку (до 38°C). Имеет несколько очагов хронической инфекции, наблюдается у онколога по поводу заболевания левой почки (нефроэктомия в 2007 г.).

С целью верификации диагноза ППИ при поступлении под УЗИ-навигацией выполнена пункция вертельной зоны, области шейки и параартикулярной области. Характер пунктата, полученного из вертельной области:

мутноватый. Посев пунктата из вертельной зоны дал MRSE. Из пунктата области шейки эндопротеза и параартикулярной зоны левого ТБС микрофлора не выделена. В общем анализе крови (ОАК) отмечались лейкоцитоз, анемия, повышение СОЭ. Нормальный уровень пресепсина и повышенный (0,071 нг/мл) – прокальцитонина – характерны для локальной бактериальной инфекции. Рентгенографически выявлены септическая нестабильность компонентов эндопротеза левого ТБС и наличие объёмного образования полости малого таза. По согласованию с онкологом проведен I этап двухэтапного ревизионного эндопротезирования с установкой цементного артикулирующего спейсера с добавлением антибиотика. При микроскопии отпечатков интраоперационных биоптатов окрашенных по Граму: лейкоциты – до 8 в поле зрения (п/з). Во всех 4-х образцах интраоперационного биоматериала (перипротезные ткани) при культуральном исследовании рост MRSE.

В течение последующих 12 нед после I этапа ревизии амбулаторно проведён 3-кратный посев пунктата левого ТБС и определение чувствительности к антибиотикам с инкубацией до 14 сут, результаты отрицательные. Через 12 нед пациентка поступила в Центр на II этап ревизионного эндопротезирования с удалением лечебного спейсера. ОАК не выявил воспалительной реакции. На УЗИ левого ТБС – содержимое смешанного характера по латеральной поверхности верхней трети бедра. При микроскопии отпечатков биоптатов окрашенных по Граму, полученных в ходе операции, обнаружены лейкоциты – до 5 в п/з. Культуральное исследование 4-х образцов интраоперационного биоматериала (перипротезные ткани) показало отсутствие роста во всех образцах.

Учитывая рост MRSE на I этапе ревизии, отсутствие роста микроорганизмов в пунктатах левого ТБС перед II этапом ревизии и в интраоперационном биоматериале, для определения гена резистентности микроорганизма в качестве критерия излеченности ППИ дважды проведено ПЦР-исследование (пунктат левого ТБС, интраоперационный биоптат), результаты отрицательны: ДНК *S. aureus* не обнаружена, ген *mecA* не обнаружен.

В 2018 г. (через 4 года после II этапа ревизии) пациентка обратилась в Центр с жалобами на боль в левом коленном суставе и опухолевидное образование в нижней трети левого предплечья (около 3 лет). Жалобы со стороны оперированного левого ТБС отсутствовали, при контрольном осмотре клинко-рентгенологических признаков рецидива ППИ не выявлено. При УЗИ – грануляционные изменения парапротезной зоны. МРТ-исследование поясничного отдела позвоночника с миелографией и КТ исследование левого лучезапястного сустава выявили объёмное образование малого таза с признаками метастатического поражения костей. Пациентка направлена на консультацию и лечение к онкологу по месту жительства.

В 2019 г., ещё через 1 год после данного обращения (5 лет после первой ревизии), пациентка упала на коленные суставы с формированием гематомы, что привело к резкому ухудшению состояния левого ТБС: резкая боль и отёк в левом бедре, повышение температуры тела до 39° С. В течение 4 дней перед госпитализацией в Центр принимала амоксицилин. При госпитализации: повышение СРБ до 149 мг/л, в ОАК – картина выраженного воспаления (лейкоцитоз $13,35 \times 10^9/\text{л}$, анемия – гемоглобин 77 г/л, СОЭ по Вестергрену 119 мм/ч). Повышенные уровни пресепсина (2123 пг/мл) и прокальцитонина (0,192 нг/мл) послужили

ли основанием для поиска локального очага инфекции и не исключали системной воспалительной реакции. Повышенный уровень креатинина крови (133 мкмоль/л) и снижение скорости клубочковой фильтрации (42 мл/мин по формуле Cockcroft-Gault при норме для данной пациентки не менее 90 мл/мин) свидетельствовали о нарушении фильтрационной функции почек. КТ-исследование органов брюшной полости выявило признаки объемного образования малого таза с метастазами рёбер, позвонков, костей таза.

При УЗИ левого ТБС – наличие жидкого содержимого в полости эндопротеза в значительном объёме, с признаками инфицирования и формирования свищевого хода. Рентгенологические признаки септической нестабильности компонентов эндопротеза подтвердили развитие реинфекции парапротезной зоны левого ТБС. Для верификации диагноза ППИ под УЗ-навигацией до операции выполнена пункция левого ТБС на цитоз и культуральное исследование. Выявлены характерные признаки ППИ – лейкоцитов 200 тыс. в 1 мкл, в т. ч. палочкоядерные нейтрофилы (ПЯН) – 94%. При культуральном исследовании пунктата аэробные и анаэробные микроорганизмы не обнаружены. Выполнен I этап повторного двухэтапного ревизионного эндопротезирования левого ТБС (реревизия) с удалением компонентов эндопротеза и установкой цементного артикулирующего спейсера с добавлением антибиотика. Исследование интраоперационного аспирата выявило повышенный цитоз – 240 тыс. в 1 мкл (ПЯН – 95%). В отпечатках интраоперационных биоптатов окрашенных по Граму: лейкоциты – до 15, макрофаги – 1-2 в п/з. Рост микроорганизмов (с инкубацией до 14 сут) не обнаружен ни в одном из 6 образцов интраоперационного биоматериала (в т. ч. смывы с удалённых компонентов эндопротеза после УЗ-обработки и интраоперационный аспират из полости левого ТБС).

Учитывая выраженные клинические, лабораторные, рентгенологические признаки ППИ при отсутствии роста микроорганизмов в биоматериале и смывах с компонентов эндопротеза, MRSE в анамнезе (при первой ревизии в 2014 г.), наличии сопутствующего заболевания, сопровождающегося иммуносупрессией, проведено ПЦР-исследование интраоперационного аспирата и смывов с удалённых компонентов эндопротеза (после УЗ-обработки) на детекцию ДНК *S. aureus* и ген *mecA*. Дополнительным аргументом к проведению ПЦР-исследования послужила необходимость назначения этиотропной антибиотикотерапии. Применение ванкомицина (в связи с подозрением на MRSE) противопоказано в связи с его нефротоксичностью, учитывая признаки почечной недостаточности у пациентки. В смывах с удалённых компонентов эндопротеза обнаружена ДНК MSSA – $5,45 \times 10^3$ копии/мл. Ген *mecA* не обнаружен. В интраоперационном аспирате из полости левого ТБС при ПЦР-исследовании ДНК *S. aureus* и ген *mecA* не обнаружены. Через 3 нед после I этапа реревизии пациентка выписана, амбулаторно получила курс антимикробной терапии с учётом результатов ПЦР-исследования.

Через 8 нед после I этапа реревизии пациентка госпитализирована для проведения II этапа реревизии левого ТБС. Для контроля качества санации в день госпитализации под УЗ-навигацией выполнены пункции левого ТБС и вертельной области левого ТБС: обнаружены лейкоциты 1275 в 1 мкл (ПЯН – 51%) и 1500 в 1 мкл (ПЯН – 62%) соответственно. Результат культурально-го исследования отрицательный. При госпитализации в

ОАК лейкоциты в пределах нормы, анемия. Сохраняются повышенные показатели СОЭ по Вестергрену до 95 мм/ч, пресепсина (506 пг/мл), прокальцитонина (0,056 нг/мл) и СРБ (39,4 мг/л).

Выполнен II этап реревизии с удалением компонентов спейсера и установкой постоянного эндопротеза. В интраоперационном аспирате из левого ТБС на цитоз – лейкоциты 2125 в 1 мкл (ПЯН – 50%). При микроскопии интраоперационных отпечатков биоптатов: лейкоциты – до 6 в п/з. В образцах интраоперационного биоматериала, в том числе смывах с удалённых компонентов спейсера (после УЗ-обработки) и интраоперационном аспирате из левого ТБС (с инкубацией до 14 сут) рост микроорганизмов не выявлен. ПЦР-исследование пунктата левого ТБС, пунктата вертельной зоны левого ТБС (до операции), смыва с удалённых компонентов спейсера (после УЗ-обработки), интраоперационного аспирата из левого ТБС не выявило ДНК *S. aureus* и гена *mecA*.

Обсуждение. В ряде случаев при перипротезной инфекции врачи – травматологи-ортопеды имеют дело с отрицательными результатами культурального исследования биоматериала пациента и смывов с компонентов эндопротезов при наличии клинических проявлений ППИ, подтверждённых данными лабораторной диагностики и рентгенообследования. Такие ситуации наблюдаются в 10-30% случаев и вызваны предшествующей антибиотикотерапией на ранних стадиях инфекционного осложнения [13]. После оперативного лечения ППИ для подбора адекватной антибиотикотерапии таким пациентам необходимо хотя бы косвенно определить вид возбудителя инфекции, что достигается применением дополнительных методов диагностики – таких, как ПЦР [18-21]. Нам описано подобное клиническое наблюдение. После курса антибиотикотерапии, назначенной по итогам первого ПЦР-исследования, в организме пациентки отсутствуют следы ДНК искомого инфекционного агента. Повторно проведенная ПЦР подтвердила точность первичной диагностики источника инфекции, но и проиллюстрировала успешность санации перипротезной инфекции подобранным антибактериальным препаратом на предыдущем этапе исследования.

Заключение. Показана эффективность ПЦР-диагностики ППИ при наличии культууроотрицательной инфекции. Важно исследовать смывы с компонентов эндопротеза после предварительной обработки компонентов в УЗ-мойке, обеспечивающей отделение биоплёнки от металлических поверхностей и дающей возможность обнаружения микроорганизмов в смыве при последующем его исследовании.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (pp. 2-10, 12-15, 17-21
см. REFERENCES)

1. Тихилов Р.М., Шубняков И.И., Коваленко А.Н. Данные регистра эндопротезирования тазобедренного сустава РНИИТО им. Р.Р. Вредена за 2007-2012 годы. *Травматология и ортопедия России*. 2013;(3):167-90.
11. Божкова С.А., Тихилов Р.М., Краснова М.В., Рукина А.Н. Ортопедическая имплантат-ассоциированная инфекция: ведущие возбудители, локальная резистентность и рекомендации по антибактериальной терапии. *Травматология и ортопедия России*. 2013;(4):5-15. <https://doi.org/10.21823/2311-2905-2013-4-5-1512>.

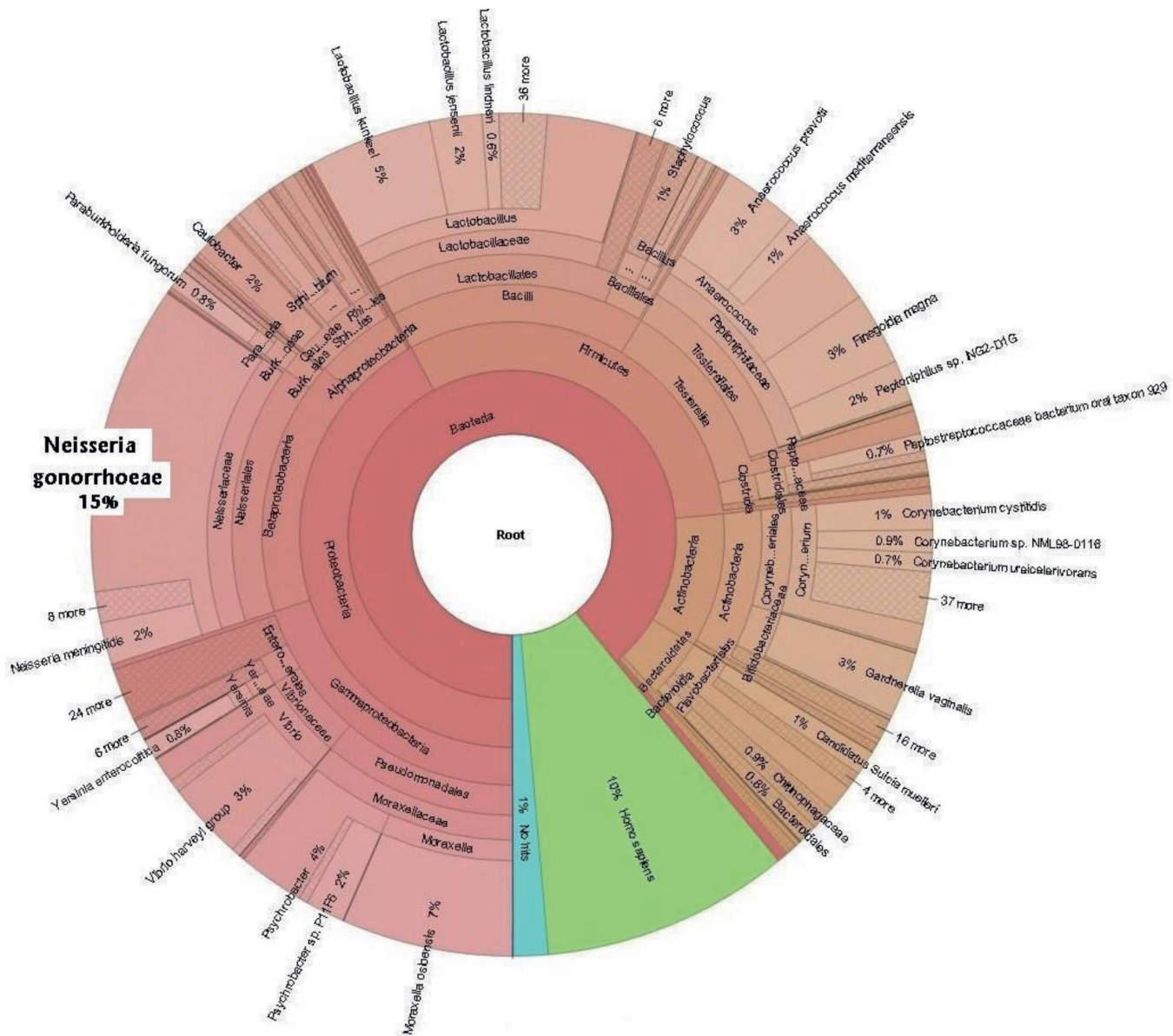
16. Николаев Н.С., Любимова Л.В., Пчелова Н.Н., Преображенская Е.В., Алексеева А.В. Использование имплантатов с покрытием на основе двумерно-упорядоченного линейно-цепочечного углерода, легированного серебром, для лечения перипротезной инфекции. *Травматология и ортопедия России*. 2019;25(4):98-108. <https://doi.org/10.21823/2311-2905-2019-25-4-98-108>

REFERENCES

1. Tikhilov R.M., Shubnyakov I.I., Kovalenko A.N., Cherniy A.Z., Muravyeva Y.V., Goncharov M.Y. Data of hip arthroplasty registry of Vreden Institute for the period 2007-2012 years. *Travmatologiya I ortopediya Rossii*. 2013;(3):167-90. (in Russian)
2. Lichstein P., Gehrke T., Lombardi A. One-stage vs two-stage exchange. *J. Arthroplasty*. 2014;29,2 Suppl.:108-11.
3. Puhto A., Puhto T., Syrjala H. Short-course antibiotics for prosthetic joint infections treated with prosthesis retention. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;(18):1143-8.
4. Lie S.A., Engesaeter L.B., Havelin L.I. et al. Dependency issues in survival analyses of 55,782 primary hip replacements from 47,355 patients. <https://doi.org/10.1002/sim.19055>
5. Adeli B., Parvizi J. The Infected Hip: A Treatment Algorithm. *Semin. Arthro.* 2011; Elsevier Inc. 22:100-2.
6. Bozic K.J., Lau E., Kurtz S., Ong K., Rubash H., Vail T.P. et al. Patient-related risk factors for periprosthetic joint infection and postoperative mortality following total hip arthroplasty in Medicare patients. *Bone Joint Surg. Am.* 2012;94(9):794-800.
7. Perka C., Haas N. [Periprosthetic infection]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizen*. 2011;82(3): 218-26.
8. Parvizi J., Gehrke T., Chen A.F. Proceedings of the International Consensus in Periprosthetic Joint Infection. *Bone Joint J.* 2013;95-B(11):1450-2.
9. Renz N., Trampuz A. Pocet Guide to Diagnosis & Treatment of Periprosthetic joint infection. Version: 10.10.2015
10. Trampuz C., Perka O., Borens O. Gelenkprotheseninfektion: Neue Entwicklungen in der Diagnostik und Therapie. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2013;138(31/32):1571-3.
11. Bozhkova S.A., Tikhilov R.M., Krasnova M.V., Rukina A.N. Orthopedic implant-associated infection: the main etiological agents, local resistance and antimicrobial therapy recommendations. *Travmatologiya I ortopediya Rossii*. 2013;(4): 5-15. (in Russian)
12. Zimmerli W., Trampuz A. Biomaterials-associated infection: a perspective from the clinic. In: Biomaterials Associated Infection: Immunological Aspects and Antimicrobial Strategies. Moriarty T.F., Zaat S.A.J., Busscher H. eds.; *Springer*: NY, Heidelberg Dordrecht: London, ed. © Springer Science+Business Media; New York: 2013;3-24.
13. Corvec S., Portillo M.E., Pasticci B.M., Borens O., Trampuz A. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int. J. Artif Organs*. 2012;35(10): 923-34.
14. Barberán J. Management of infections of osteoarticular prosthesis. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006;12 (3 Suppl.): 93-101. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01400.x>
15. Brady R.A., Calhoun J.H., Leid J.G., Shirtliff M.E. Infections of orthopaedic implants and devices. In: Biofilms and Device-Related infections. Shirtliff M.E., Leid J.G. eds. New-York: Springer; 2009:15-56.
16. Nikolaev N.S., Lyubimova L.V., Pchelova N.N., Preobrazhenskaya E.V., Alekseeva A.V. Treatment of Periprosthetic Infection with Silver-Doped Implants Based on Two-Dimensional Ordered Linear Chain Carbon. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2019;25(4): 98-108. <https://doi.org/10.21823/2311-2905-2019-25-4-98-108>. (in Russian)
17. Trampuz A., Piper K.E., Jacobson M.J., Hanssen A.D., Unni K.K., Osmon D.R. et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357(7):654-63. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061588>
18. Moshirabadi A., Razi M., Arasteh P., Sarzaeem M.M., Ghaffari S., Aminiafshar S., Hosseinian Khosroshahy K., Sheikholeslami F.M. Polymerase Chain Reaction Assay Using the Restriction Fragment Length Polymorphism Technique in the Detection of Prosthetic Joint Infections: A Multi-Centered Study. *J. Arthroplasty*. 2019 Feb;34(2):359-64. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2018.10.017>
19. Reuwer A.Q., van den Bijllaardt W., Murk J.L., Buiting A.G.M., Verweij J.J. Added diagnostic value of broad-range 16S PCR on periprosthetic tissue and clinical specimens from other normally sterile body sites. *J. Appl. Microbiol.* 2019; Feb.126(2):661-6. <https://doi.org/10.1111/jam.14156>
20. Lausmann C., Zahar A., Citak M., Brañes J., Schmidl S., Frommelt L., Gehrke T., Gebauer M. Are There Benefits In Early Diagnosis Of Prosthetic Joint Infection With Multiplex Polymerase Chain Reaction? *J. Bone Jt. Infect.* 2017 Sep 28;2(4):175-83. <https://doi.org/10.7150/jbji.22062>
21. Rak M., Kavčič M., Trebše R., Cör A. Detection of bacteria with molecular methods in prosthetic joint infection: sonication fluid better than periprosthetic tissue. *Acta Orthop.* 2016; Aug.87(4):339-45. <https://doi.org/10.3109/17453674.2016.1165558>

Поступила 22.01.20

Принята к печати 27.01.20



Результат метагеномного исследования отделяемого уретры мужчины с клиническим подозрением на гонококковую инфекцию.