

ОАО «ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»

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

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

Д КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Том 63

5 • 2018

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

Е Ж Е М Е С Я Ч Н Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Ж У Р Н А Л

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

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. 8-903-724-40-29

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

Художественный редактор

Е. М. Архипова

Переводчик *В. С. Нечаев*

Корректор *В. С. Смирнова*

Технический редактор *Л. В. Зюкина*

Сдано в набор 20.04.2018.

Подписано в печать 20.05.2018.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW страница: www.medlit.ru

ЛР N 010215 от 29.04.97 г.

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

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

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

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.aks.ru,

www.pressa-ef.ru

Подписка на электронную версию:

elibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клини. лаб. диагностика.
2018. № 5. 257–320.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

Главный редактор В. Н. ТИТОВ

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

А.Н. АРИПОВ (*Ташкент*), Т.В. ВАВИЛОВА (*Санкт-Петербург*), I. WATSON (*Великобритания, Ливерпуль*), А.Ж. ГИЛЬМАНОВ (*Уфа*), Д.А. ГРИЩЕНКО (*Красноярск*), В.С. ГУДУМАК (*Кишинёв*), Н.Г. ДАШКОВА (*Москва*), В.А. ДЕЕВ (*Киев*), Т.И. ДОЛГИХ (*Омск*), С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА (*Барнаул*), А.В. ИНДУТНЫЙ (*Омск*), А. KALLNER (*Швеция, Стокгольм*), А.И. КАРПИЩЕНКО (*Санкт-Петербург*), К.П. КАШКИН (*Москва*), Г.И. КОЗИНЕЦ (*Москва*), А.В. КОЗЛОВ (*Санкт-Петербург*), В.Г. КОЛБ (*Минск*), Г.В. КОРШУНОВ (*Саратов*), Г.М. КОСТИН (*Минск*), А.Г. КОЧЕТОВ (*Москва*), Н.Е. КУШЛИНСКИЙ (*Москва*), Г.Г. ЛУНЕВА (*Киев*), А.Р. МАВЗЮТОВ (*Уфа*), В.Н. МАЛАХОВ (*Москва*), Д.Д. МЕНЬШИКОВ (*Москва*), В.И. НИГУЛЯНУ (*Кишинёв*), 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 63
5 • 2018

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

ADVERTISING DEPARTMENT

Phone: 8-495-678-64-84

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

Art editor *E.M. Arkhipova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.V. Zyukina*

E-mail: oao-meditsina@mail.ru

WWW page: www.medlit.ru

LR № 010215 of 29.04.1997

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

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

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief V. N. TITOV

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

EDITORIAL COUNCIL:

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



IZDATEL'STVO "MEDITSINA"

БИОХИМИЯ

- Калинин А.В., Крашенинников В.Н., Титов В.Н. Спектрометрия изомеров триглицеридов жирных кислот в жировых продуктах: сливочном и пальмовом маслах. 260
- Кубасов Р.В., Барачевский Ю.Е., Иванов А.М., Кубасова Е.Д. Гормональные показатели системы гипофиз – надпочечники у комбатантов при командировке в «горячие точки» 267
- Бахарева Ю.С., Потеряева О.Н., Чапаева Н.Н., Щербаклова Л.В. Исследование активности матричных металлопротеиназ и реактантов воспаления у пациентов с эндокардитами 272
- Бельская Л.В., Сарф Е.А. Околосуточная динамика состава слюны человека по данным ИК-Фурье-спектроскопии 277
- Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С. Значение определения уровня гомоаргинаина у пациентов с ишемической болезнью сердца при операциях реваскуляризации миокарда 281
- Голощанов-Аксёнов Р.С. Прогнозирование и диагностика острого коронарного синдрома по информативным параметрам 287

ЦИТОЛОГИЯ

- Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатъев П.С., Самоделькин А.Г., Белов А.А., Гушин В.А. Оценка генотоксических эффектов в буккальном эпителии при нарушениях адаптационного статуса организма 290

ИММУНОЛОГИЯ

- Платонова В.В., Севбитов А.В., Шакарьянц А.А., Дорофеев А.Е. Экспериментально-клиническое обоснование лечения больных одонтогенными флегмонами челюстнолицевой области с использованием в комплексной терапии препарата Даларгин 293
- Кузнецова Д.А., Лапин С.В., Гайдукова И.З., Ребров А.П., Маслянский А.Л. Клинико-диагностическая значимость аутоантител к CD74 при аксиальных спондилоартритах. 297
- Рясенский Д.С., Асеев А.В., Эльгали А.И. Состояние мембран мононуклеарных лейкоцитов у больных туберкулезом легких. 301
- Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю., Агабеков А.И., Рзаева Т.Ш. Изменения клеточного состава крови и гормонального баланса при аденокарциноме восходящего отдела ободочной кишки как диагностические критерии развития процессов метастазирования 306
- Кюрегян К.К., Потёмкин И.А., Лопатухина М.А., Попова О.Е., Исаева О.В., Малинникова Е.Ю., Романенко В.В., Поляков А.Д., Михайлов М.И. Длительность сохранения анamnестических антител к вирусу гепатита С. 310

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Лямин А.В., Исмагуллин Д.Д., Жестков А.В., Кондратенко О.В. Лабораторная диагностика микобактериозов у пациентов с муковисцидозом (обзор литературы) 315

BIOCHEMISTRY

- Kalinin A.V., Krashennnikov V.N., Titov V.N. The spectrometry of isomers of triglycerides of fatty acids in fatty buttery products: butter and palm oil 260
- Kubasov R.V., Barachevsky Yu.E., Ivanov A.M., Kubasova E.D. The hormonal indices of hypophysis-adrenal glands system in combatants during business trip to "trouble spots" 267
- Bakhareva Yu.S., Poteryaeva O.N., Chapaeva N.N., Scherbakova L.V. The study of activity of matrix metalloproteinases and reactants of inflammation in patients with endocarditis 272
- Bel'skaya L.V., Sarf E.A. The circadian dynamics of composition of human saliva according data of infrared -Fourier-spectroscopy 277
- Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S. The value of detection of homoarginine level in patients with ischemic heart disease under operations of myocardium re-vascularization 281
- Goloschapor-Aksenov R.S. The prognostication and diagnostic of acute coronary syndrome according informative parameters 287

CYTOLOGY

- Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Samodelkin A.G., Belov A.A., Gushchin V.A. The evaluation of genotoxic effects in buccal epithelium under disorders of adaption status of organism 290

IMMUNOLOGY

- Platonova V.V., Sevbitov A.V., Shakaryants A.A., Dorofeev A.E. The experimental clinical substantiation of treatment of patients with odontogenic phlegmon of maxillofacial area using Dalargin in complex therapy 293
- Kuznetsova D.A., Lapin S.V., Gaydukova I.Z., Rebrov A.P., Maslyansky A.L. The clinical diagnostic significance of auto antibodies to CD74 at axial spondylarthrosis 297
- Ryasensky D.S., Aseev A.V., Elgali A.I. The state of membranes of mononuclear leukocytes in patients with tuberculosis of lungs 301
- Chesnokova N.P., Barsukov V.Yu., Agabekov A.I., Rzaeva T.Sh. The alterations of cellular composition of blood and hormonal balance under adenocarcinoma of ascending part of colon as diagnostic criteria of development of processes of metastasis 306
- Kyuregyan K.K., Potemkin I.A., Lopatukhina M.A., Popova O.E., Isaeva O.V., Malinnikova E.Yu., Romanemko V.V., Polyakov A.D., Mikhailov M.I. The duration of preservation of anamnestic antibodies to hepatitis C virus 310

MICROBIOLOGY

- Lyamin A.V., Ismatullin D.D., Zhestkov A.V., Kondratenko O.V. The laboratory diagnostic in patients with mucoviscidosis: the publications review 315

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 613.288:547.295]-074:543.42.062

Калинин А.В.¹, Крашенинников В.Н.¹, Титов В.Н.²

СПЕКТРОМЕТРИЯ ИЗОМЕРОВ ТРИГЛИЦЕРИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЖИРОМАСЛЯНЫХ ПРОДУКТАХ: СЛИВОЧНОМ И ПАЛЬМОВОМ МАСЛАХ

¹ФГБУН «Институт спектроскопии» РАН, 142190, Москва, Троицк;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава РФ, 121552, Москва

Известны различия физико-химических свойств и физиологической роли в организме позиционных изомерных форм триглицеридов жирных кислот (ЖК), потребляемых с пищей. Для дифференциации и анализа их содержания возможно применение спектроскопии комбинационного рассеяния света. Оба эти обстоятельства следует учитывать и использовать в решении практических задач диетологии, например в определении фальсификации и замены сливочного масла и спредов пальмовым маслом, а также при контроле соотношений ЖК, потребляемых пациентами с кардиологической и онкологической патологией.

Цель работы – определение возможности анализа позиционных изомеров ЖК, характерных для сливочного и пальмового масел, с помощью портативных и оперативных спектрометров поглощения в ближнем инфракрасном (БИК) диапазоне. С применением метода проекций на латентные структуры получены калибровки спектрометров для определения содержания 7 регламентированных ЖК и долей молочного жира и пальмового масла в жиромасляных смесях по спектрам рамановского и БИК-спектрометров. Подтверждена возможность идентификации позиционных изомеров животных и растительных триглицеридов по рамановским спектрам. Кроме того, установлено, что эффективность определения долей указанных выше жиров и масел (достоверность, точность и селективность определения) как по рамановским спектрам, так и по спектрам оптической плотности БИК-диапазона заметно выше показателей определения долей масел и жиров по содержанию семи ЖК. По нашему мнению, этот факт отражает чувствительность БИК-спектров поглощения не только к длине углеродной цепи и степени ненасыщенности (числу двойных связей C=C) ЖК, но и к позиционным изомерным формам триглицеридов. Полученные данные использованы для формулировки технических требований и условий применения портативного БИК-спектрометра для массового анализа жиромасляных продуктов.

Ключевые слова: триглицериды жирных кислот; позиционные изомерные формы; ближняя ИК-спектроскопия; регрессия по проекциям на латентные структуры.

Для цитирования: Калинин А.В., Крашенинников В.Н., Титов В.Н.. Спектрометрия изомеров триглицеридов жирных кислот в жиромасляных продуктах: сливочном и пальмовом маслах. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (5): 260-267. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-260-267>

Kalinin A.V.¹, Krasheninnikov V.N.¹, Titov V.N.²

THE SPECTROMETRY OF ISOMERS OF TRIGLYCERIDES OF FATTY ACIDS IN FATTY BUTTERY PRODUCTS: BUTTER AND PALM OIL

¹The Federal State Budget Institution of Science "The Institute of Spectroscopy" of the Russian Academy of Sciences, 142190, Moscow, Russia

²The Federal State Budget Institution "The National Medical Research Center of Cardiology" of Minzdrav of Russia, 121552, Moscow, Russia

In organism, differences in physical chemical properties and physiological role of positional isomeric forms of triglycerides of fatty acids consumed with food are well known. The Raman spectroscopy to analyze there is possible to be applied. Both of these circumstances are to be considered and applied in resolving practical issues of dietetics, i.g., in detection of falsification and replacement of butter and spreads with palm oil, as well as in monitoring ratio of fatty consumed by patients with cardiologic and oncologic pathology. The purpose of study is to determine possibilities of analyzing positional fatty acids isomers specific for butter and palm oil using portable and operational spectrometers of absorption in near infrared range. The technique of projections on latent structures was applied to obtain calibrations of spectrometers to detect content of 7 regulated fatty acids and percentage of milk fat and palm oil in fat-oil mixtures according specters of Raman and near infrared range spectrometers. The possibility of identifying positional isomers of animal and vegetable triglycerides according Raman spectra was confirmed. Besides, it is established that efficiency of determining (reliability, accuracy and selectivity) the proportions of the above oils using both Raman spectra and near-infrared optical density spectra was much higher than when calculating the percentage of the same oils using the content of 7 fatty acids. This fact reflects sensitivity of near infrared range absorption spectra both to length of the carbon chain and degree of unsaturation (number of double bonds C=C) of fatty acids and positional isomeric forms of triglycerides. The obtained data are used in formulating technical requirements and conditions for application of portable near infrared range spectrometer for mass analysis of fat-oil products.

Key words: triglycerides of fatty acids; positional isomeric forms; near infrared spectrometry; regression on projections to latent structures.

Для корреспонденции: Калинин Андрей Валентинович, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. ФГБУН «Институт спектроскопии» РАН; e-mail: kalinin@isan.troitsk.ru

For citation: Kalinin A.V., Krashennnikov V.N., Titov V.N. *The spectrometry of isomers of triglycerides of fatty acids in fatty buttery products: butter and palm oil. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(5): 260-267. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-260-267>*

For correspondence: Kalinin A.V., candidate of physical mathematical sciences, senior researcher of the Federal State Budget Institution of Science "The Institute of Spectroscopy", e-mail: kalinin@isan.troitsk.ru

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

Acknowledgment. *The study was implemented with financial support of the Russian Foundation of Fundamental Studies in the Project № 16-02-00277.*

Received 23.10.2018
 Accepted 17.01.2018

Введение. Все природные жиры и масла состоят примерно на 98,5% из триглицеридов (ТГ) – эфиров разных жирных кислот (ЖК) с трёхатомным спиртом глицерином. ЖК отличаются числом атомов углерода в цепи и степенью ненасыщенности – числом двойных связей (ДС) и их положением между атомами углерода (C=C). Кроме того, ТГ ЖК отличаются позиционной изомерией – местом связи ЖК с атомами С глицерина: первичной эфирной связью в позиции sn-1 и sn-3 и вторичной эфирной связью в sn-2 (рис. 1).

Известно [1–3], что позиционные изомеры ТГ ЖК в пище клетки организма усваивают посредством специфических ферментов и активирующих их гормональных медиаторов, причём ЖК усваиваются наиболее полно преимущественно из позиции sn-2. В зависимости от того, какая ЖК этерифицирована в sn-2 с вторичной спиртовой группой глицерина, мы разделяем ТГ на пальмитиновые, олеиновые, стеариновые, линолевые и т. д.

Человек потребляет с пищей масла, которые получают при отжиме фруктов (оливковое), семян злаков (кукурузное), масличных культур (подсолнечное, льняное), бобовых растений (соевое, арахисовое), горчичных культур (рапсовое масло, *canolla oil*). Все растительные масла жидкие; в составе ТГ в sn-2 преобладают ненасыщенные ЖК, главным образом олеиновая мононенасыщенная ω-9, цис С18:1. В твёрдых жирах животного происхождения, например в сливочном жире из молока коров, в sn-2 доминирует С16:0 пальмитиновая насыщенная ЖК [4]. В свином жире сальника в sn-2 ТГ преобладает С14:0 миристиновая насыщенная ЖК (НЖК). Их также можно охарактеризовать по составу позиционных изомеров ТГ; в них этерифицированы главным образом миристиновая, пальмитиновая НЖК с температурой плавления +63°C и стеариновая ЖК с точкой плавления +73°C, в форме вплоть до афизиологичных позиционных изомеров ТГ, таких как пальмитоил-пальмитоил-пальмитат (ППП), трипальмитат, стеарил-стеарил-стеарат-глицерол, тристеарат.

Эти ТГ имеют высокую точку плавления и низкую скорость всех реакций метаболизма, в том числе и липолиза – освобождения ЖК из состава ТГ в форме свободных жирных кислот (СЖК) в межклеточную среду [5]. Пальмитиновые, стеариновые и миристиновые ТГ (миристоил-миристоил-пальмитолеат) придают жирам твёрдую консистенцию; твёрдыми являются говяжий, бараний жир, жир морских животных, например китовый. Жидкую фракцию липидов содержит гусиный жир; обусловлено это высокой мерой ненасыщенности ЖК (числом ДС в линолевых и линоленовых ТГ).

Несмотря на то что в ТГ пальмового масла этерифицировано около 50% пальмитиновой НЖК, в sn-2 с глицерином этерифицирована только олеиновая МЖК (моноеновая с одной ДС); на этом основании пальмовое

масло именуют «тропическим олеиновым маслом», по сути, это растительное оливковое масло. Ни оливковое, ни пальмовое масло не содержат пальмитиновых позиционных изомеров ТГ, таких как олеил-пальмитоил-олеат (ОПО), пальмитоил-пальмитоил-олеат (ППО) и олеил-пальмитоил-пальмитат (ОПП); все ТГ в пальмовом масле – олеиновые. Если в оливковом масле доминируют олеиновые ТГ, такие как олеил-олеил-олеат (ООО), и мало олеил-олеил-пальмитата (ООП), то в пальмовом масле в каждом из олеиновых ТГ этерифицирована одна пальмитиновая НЖК в sn-1 или sn-3. В пальмовом масле доминируют олеиновые позиционные изомеры ТГ, такие как пальмитоил-олеил-олеат (ПОО), ООП и пальмитоил-олеил-пальмитат (ПОП). В пальмовом масле вся пальмитиновая НЖК этерифицирована с первичными спиртовыми группами глицерина в sn-1 или sn-3; в sn-2 же со вторичной спиртовой группой всегда этерифицирована только олеиновая МЖК [6]. При гидролизе пальмового масла в тонкой кишке панкреатическая липаза освобождает пальмитиновую НЖК из sn-1- и sn-3- позиций ТГ в форме СЖК.

При высоком содержании пальмитиновой НЖК (≈ 40%) в растительном, олеиновом, пальмовом масле добавление его в пищу повышает содержание холестерина (ХС) в плазме крови, но повышение содержания ХС в липопротеидах низкой плотности (ХС-ЛПНП) у добровольцев в 4 раза менее выражено (лишь на 27%) по сравнению со сливочным жиром [7]. Важно понять причину столь незначительного повышения содержания ХС-ЛПНП в крови при добавлении в пищу пальмитиновой НЖК в составе олеиновых ТГ пальмового масла, в котором её больше, чем в пальмитиновых ТГ сливочного жира. На основании столь невыраженного повышения содержания ХС-ЛПНП нет оснований рассматри-

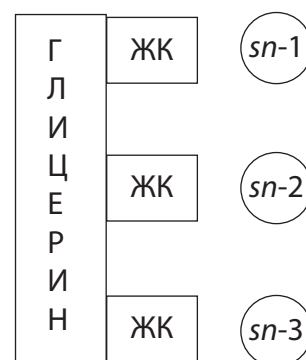


Рис. 1. Структура ТГ – эфиров трехатомного спирта глицерина и трёх ЖК: sn-1 и sn-3 – позиции этерификации ЖК с двумя первичными спиртовыми группами и sn-2 – со вторичной спиртовой группой.

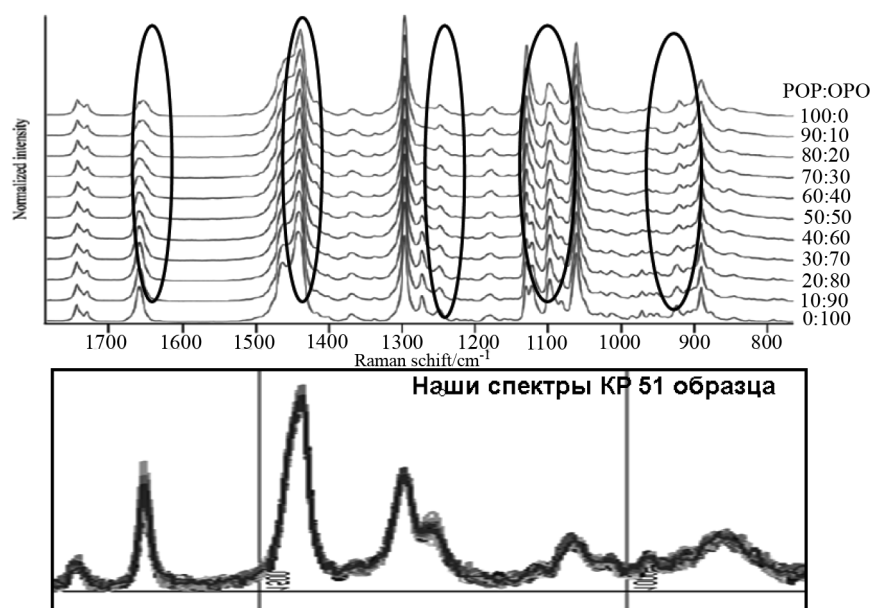


Рис. 2. Изменение спектра КР (в овалах) при вариации соотношения изомеров растительного (POP) и животного (OPO) типа в бинарной смеси из работы [12] – сверху, и измеренные нами спектры КР партии смесей молочного жира и растительных масел – внизу.

вать потребление с пищей пальмового масла как фактор риска патологии сердечно-сосудистой системы, атеросклероза и атероматоза ни на основании клинических наблюдений [8], ни по результатам экспериментальных данных [9].

Столь выраженное различие содержания в плазме крови ХС-ЛПНП при добавлении в пищу равных количеств сливочного жира и пальмового масла зависит, мы полагаем, от двух факторов: а) физико-химического различия позиционных изомеров ТГ в растительном пальмовом масле и в животном жире молока; б) особенностей стерической (позиционной) специфичности фермента – панкреатической липазы и её кофакторов – жёлчных кислот, активных эндогенных детергентов.

Физико-химическими особенностями пальмового масла является то, что все ТГ в нём олеиновые и в sn-2 этерифицирована только олеиновая МЖК. Вся же пальмитиновая НЖК этерифицирована в sn-1 и sn-3. Физико-химическими особенностями «конечных» ТГ молока (жира молока), которые являются пальмитиновыми, обусловлено, что они не предназначены для метаболизма *in vivo* у матери. Вся пальмитиновая НЖК в ТГ молока находится в sn-2, а большее количество олеиновой МЖК, немного ненасыщенных и полиеновых ЖК этерифицированы в sn-1 и sn-3 [4].

Панкреатическая липаза, гидролизуя экзогенные ТГ пищи, проявляет выраженную позиционную специфичность. Она гидролизует эфирную связь в первую очередь в sn-1, далее в sn-3 и не может гидролизовать спиртовую связь в sn-2. При гидролизе ТГ пальмового масла в тонкой кишке вся пальмитиновая НЖК освобождается из ТГ в форме СЖК, а всю олеиновую МЖК энтероциты поглощают в форме 2-глицеромоноолеата. Гидролизованная из sn-1 и sn-3 ТГ молока олеиновая МЖК, небольшие количества ненасыщенных ЖК с двумя-тремя ДС (ННЖК) и полиеновых ЖК с четырьмя-шестью ДС (ПНЖК) в физико-химические реакции с соедержимым

тонкой кишки в отличие от пальмитиновой НЖК не вступают [5]. Энтероциты из гетерогенных мицелл поглощают пальмитиновую НЖК молока в форме 2-глицеромоноолеата; они ретерифицируют НЖК в одноимённые ТГ и включают в состав хиломикронов (ХМ). ХМ с пальмитиновыми ТГ молока в потоке лимфы и крови достигают печени. Далее гепатоциты после оптимизации ими экзогенных ЖК структурируют пальмитиновые ТГ в одноимённые липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП); в них экзогенную пальмитиновую НЖК поглощают клетки, в первую очередь зависимые от инсулина, путём апоЕ/В-100 эндцитоза [6]. Таким образом, как много пальмитиновой НЖК ни содержат жирное коровье молоко, жирные молочные продукты (сметана и сыры), сливочный жир, так же много их, согласно физико-химическим и биологическим закономерностям, поглощают клетки.

В отличие от ТГ молока [7], при гидролизе ТГ пальмового масла [8] всю пальмитиновую НЖК (половина всего количества ЖК) из sn-1 и sn-3 панкреатическая липаза освобождает в форме СЖК. Будучи более гидрофобной и химически активной, имея высокую точку плавления – 63°C, пальмитиновая НЖК вступает в физико-химические реакции с компонентами содержимого тонкого кишечника. В результате энтероциты всасывают существенно меньше пальмитиновой НЖК, чем её содержат ТГ пальмового масла. И если всю пальмитиновую НЖК из ТГ коровьего молока *in vivo* поглощают клетки, то большую часть пальмитиновой НЖК из пальмового масла в форме СЖК энтероциты всосать не могут; значительная часть НЖК теряется с кишечным содержимым [9]. Таким образом, поскольку пальмовое масло обладает позиционной изомерией растительных масел: олеиновая ЖК С18:1 находится в позиции sn-2, поэтому его насыщенные ЖК из позиций sn-1 и sn-3 практически не усваиваются у человека.

Следует отметить, что пальмовое масло в пище, как правило, содержит транс-жиры, возникающие при его промышленной переработке. Поэтому европейские регламенты не допускают его использования в продуктах питания.

В ряде работ [10–12] оценена возможность идентификации и количественного определения позиционных изомерных форм ТГ по спектрам комбинационного рассеяния (КР) лазерного света с помощью регрессии по проекциям на латентные структуры (ПЛС). В работе М. Motoyama [12] детально оценены вариации спектров КР смесей двух эталонных позиционных изомеров триглицеридов мажорных олеиновой и пальмитиновой ЖК, установлены их спектральные отличия в смесях различной концентрации, проиллюстрированные на рис. 2. Показано, что можно различать природные жиры путём сравнения их изоморфных форм с помощью спектроскопии КР, однако природные жиры и масла исследованы не были.

Поскольку нами ранее смеси растительных масел и сливочного жира изучены методом спектроскопии

Диапазоны вариаций долей ЖК и масел (аналитов) в 2 партиях калибровочных и тестовых образцов (в %)

№	Количество	Аналит							
		C4:0	C14:0	C16:0	C18:1	C18:0	МЖ	ПМ	ОлМ
1	35 + 15	0,5–4,2	6,0–14,0	14,0–33,0	21,0–42,0	2,5–8,5	20–80	10–60	–
2	35 + 16	0,5–3,0	5,0–11,0	14,0–25,0	24,0–48,0	2,3–3,8	20–70	20–40	0,5–20,0

Примечание. ОлМ – оливковое масло.

три в ближнем инфракрасном (БИК) диапазоне [13], представляется актуальным исследовать корреляции БИК-спектров с позиционными изомерными формами масел на основе сравнения моделей по БИК-спектрам и спектрам КР и ответить на вопрос, можно ли с помощью спектрофотометра БИК-диапазона идентифицировать животные жиры и растительные масла с учётом позиционной изомерии ТГ ЖК.

Цель работы – оценить возможности анализа позиционных изомеров ЖК, характерных для сливочного жира и пальмового масла, с помощью спектрометров КР и поглощения в ближнем ИК-диапазоне света. Решить данную задачу предполагалось путём применения метода проекций на латентные структуры [14], чтобы получить калибровку спектрометров для определения как содержания 7 регламентированных ЖК, так и долей молочного жира и пальмового масла в жиромасляных смесях. Вторая цель состояла в изучении пригодности спектрометрии КР для дифференциации животных жиров и растительных масел по позиционным изомерам ТГ. Кроме того, задачей было сравнение эффективности калибровки (достоверности, точности и селективности определения) спектрофотометра БИК-диапазона по долям поименованных выше жиров и масел по сравнению с эффективностью определения долей по содержанию индивидуальных жирных кислот, а также формулировки технических требований и условий применения портативного спектрометра для массового анализа качества жиромасляных продуктов.

Материал и методы. Формирование партий калибровочных и тестирующих образцов. Спектрометрический анализ дисперсных смесей включает трудоёмкую калибровку спектрометра по большому числу стандартных образцов с вариацией концентраций нескольких (не только определяемых, но и интерферирующих, «мешающих» компонент). Ранее мы описали и проверили «экономный» способ ПЛС-калибровки [15, 16], который даёт хорошие параметры определения содержания 3 компонент с помощью БИК-спектрометра при специальном выборе распределений концентраций компонент в партии из 35 стандартных калибровочных образцов. В названной работе приготовление партий стандартных калибровочных и тестовых жиромасляных смесей основано на включении в калибровку лишь пограничных, приосевых и центральных образцов (по концентрациям компонент). Количество из 35 калибровочных и 15–18 тестовых образцов, по данным наших работ [15, 16], пригодно по метрологическим параметрам и трудоёмкости для определения содержания 3 компонент.

Аналогичный подход осуществлён в настоящей работе при построении и тестировании ПЛС-моделей по 50 образцам партии № 1 для определения содержания насыщенных ЖК C4:0, C14:0 и C16:0 в смесях молочного жира (МЖ) и пальмового масла (ПМ), а также по 51 образцу партии № 2 для определения содержания ЖК

C18:0, C18:1 и C18:2 в смесях МЖ, ПМ и небольших добавок оливкового масла с целью имитации состава ЖК сливочного масла. Параметры образцов представлены в табл. 1. Для создания заданных вариаций долей трёх ЖК в партиях образцов, кроме исходных материалов – молочного жира, пальмового и оливкового масел, был использован также разбавитель n-октан («Fluka Analytical», Германия). Партии стандартных образцов получали смешиванием рассчитанных по «экономному» способу навесок исходных материалов, предварительно измеренных по содержанию ЖК с помощью газового хроматографа Кристаллюкс-4000М (ООО «Интехром», РФ), в соответствии с ГОСТ Р 51483-99 «Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме», с предварительной калибровкой его по смеси стандартных метиловых эфиров жирных кислот (F.A.M.E., Mix C4–C24, Supelco, № 18919). Затем содержание семи ЖК, названных выше, в двух партиях калибровочных и тестовых образцов было проверено измерением на том же хроматографе. Хранили образцы при комнатной температуре в «мягких» условиях во избежание переэтерификации [17] и использовали для спектрометрии в течение двух недель. Перед измерением в БИК-спектрометрах образцы нагревали до 59°C в термостате.

Доля лауриновой ЖК C12:0 определялась по высокой корреляции (0,98) с масляной ЖК C4:0 [18].

Пробоподготовка образцов смесей исходных материалов выполнена без применения растворителей в соответствии с приёмами, которые описаны ранее, а именно [16, 19]:

а) продукт нагревали до 60°C и центрифугировали при 4000 об/с в течение 6–18 мин;

б) нижнюю водную фракцию сливали через отверстие в пробирке;

в) верхнюю часть (иногда с протеинсодержащей пеной) отфильтровывали в термостате при 59°C.

Спектральные методы, приборы и условия измерения. БИК-спектры поглощения обеих партий стандартных образцов, содержащие молочный жир, измерили трехкратно (для проверки воспроизводимости) в 10-мм кювете с помощью созданного в Институте спектроскопии РАН дифракционного БИК-спектрометра [20] в диапазоне длин волн 1,10–1,65 мкм с разрешением 10 нм, при времени накопления 40 с и температуре образца 59 ± 1°C, выбранной, с одной стороны, для полного расплавления, а с другой – для исключения переэтерификации определяемых ЖК. Исследуемый образец разогревали до 59°C, отстаивали 3 мин, проверяли его прозрачность, измеряли его спектр в БИК-спектрометре и оцифрованный спектр использовали для калибровки или анализа.

По спектрам пропускания образцов и пустой кюветы рассчитаны спектры оптической плотности: $D_i = \log(I/I_0)$, где I – сигнал детектора, пропорциональный спектральной плотности потока, падающего на образец излучения, I_0 – сигнал детектора, пропорциональный спектральной плотности потока излучения, прошедшего сквозь i -й образец. Оцифрованные спектры затем подвергнуты предобработке: вычитанию общей базовой линии, сгла-

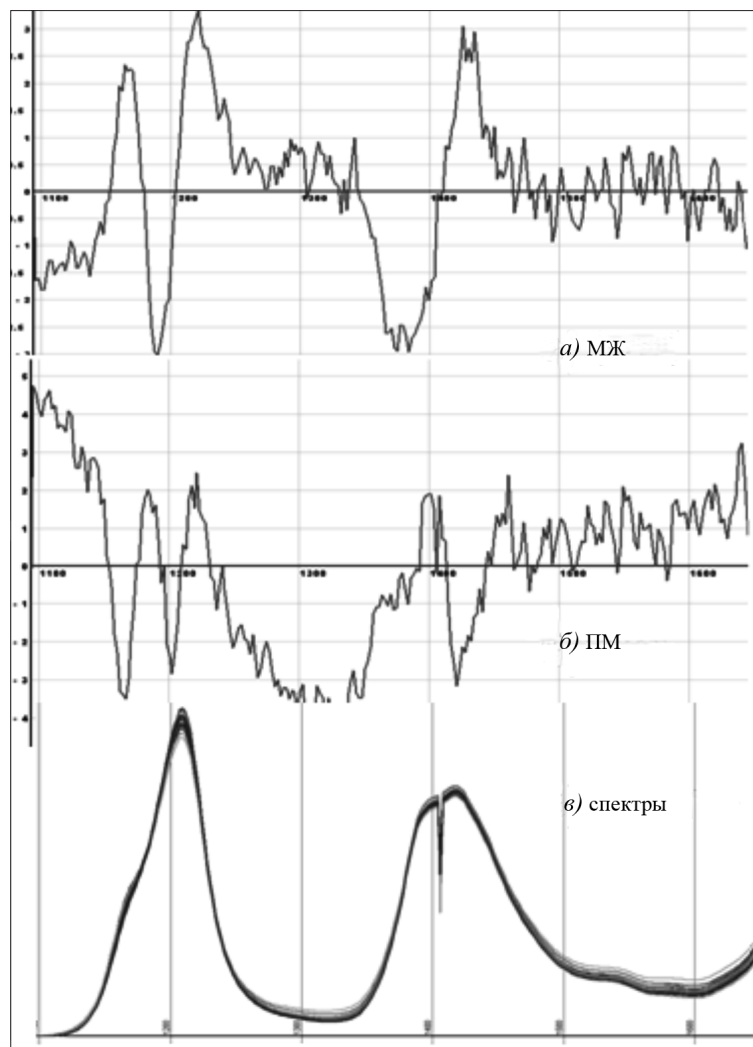


Рис. 3. Спектры: а, б – регрессионных коэффициентов для определения МЖ и ПМ, соответственно; в – оптической плотности 51 образца жировых смесей.

живанию по Голею–Савицкому и дифференцированию один или два раза.

КР-спектры образцов 2-й партии также троекратно измерены с помощью спектрометра Thermo Scientific Nicolet NXR FT с возбуждением КР-излучения лазера с длиной волны 1,06 мкм при максимальной мощности 2 Вт, температуре образца $59 \pm 1^\circ\text{C}$ и затем усреднены. Время накопления КР-спектра 2,5 мин.

Новацией работы является то, что портативный БИК-спектрометр использует множественную регрессию в соответствии с алгоритмом NIPALS [14], реализованным нами в программе ISCAP [20], для улучшения разрешения (рис. 3).

Построение и тестирование ПЛС-калибровок. Решение задачи многомерной линейной калибровки (регрессии) по матричному уравнению $Y = XB + E^*$ для многокомпонентного анализа на основе спектров состоит в:

1. В изыскании партий калибровочных образцов, стандартизированных по долям ЖК или долям жиров и масел – матрица Y .

2. Выборе технических условий спектрального метода, измерении и обработке спектров партии образцов – матрица X .

3. Создании калибровочной модели – матрицы калибровочных коэффициентов B по матрицам спектров X и показателей Y и её оптимизация, включающая:

- построение разнообразных ПЛС-моделей;
- тестирование (оценка параметров матрицы ошибок E , выбор моделей).

4. Определении показателей \hat{y} в неизвестных образцах по измеренному спектру x .

Матрица B из уравнения $Y = XB$ находится методом наименьших квадратов: минимизируя сумму квадратов отклонений полученных на стандартах значений $(Y - XB)^t(Y - XB)$, находим оценки коэффициентов матрицы B : $B = (X^t X)^{-1} X^t Y$.

Главная математическая проблема – обращение матрицы $X^t X$. Очевидно, что если число стандартных образцов меньше, чем число переменных в X , то обратной матрицы не существует.

Более того, даже при достаточно большом числе образцов обратной матрицы может и не быть из-за значительного, вплоть до линейной зависимости, подобия (коллинеарности) спектров.

Инструмент против коллинеарности – сжатие данных методом главных компонент (МГК).

В МГК (Principle Component Analysis) образуют новые переменные $t_a = p_a^1 x^1 + p_a^2 x^2 + \dots$ ($a = 1, \dots, A$), называемые главными компонентами (ГК), так что:

$$X = TP^t + E$$

ГК, или счета (scores), составляют матрицу T , вместе с матрицей нагрузок (loadings) P они воспроизводят матрицу X достаточно точно, а в остатках E остаётся только ошибка. При этом:

переменные T – ортогональны;

их значительно меньше, чем в матрице X , то есть подобие спектров преодолено и T можно использовать вместо X для построения регрессии.

В методе ПЛС-регрессии:

– сжатию подвергают обе матрицы, X и Y ;

– факторы ГК рассчитывают по очереди – алгоритмом NIPALS [14];

– получают 2 набора счетов (scores) T , U и нагрузок (loadings) P , Q плюс матрица W взвешенных нагрузок (loading-weights);

– итерационно улучшают модель, чтобы максимизировать $\text{cov}(T, U)$;

– выполняют предсказание:

$$\hat{Y} = X_{\text{new}} B \\ B = W^t(P^t W)^{-1} Q^t$$

Построенные модели (матрицы B) тестируют партией стандартов, не использованных для калибровки, и выбирают модели с наилучшими показателями достоверности – коэффициента множественной корреляции r^2 , сложности p – числа ГК и погрешности – случайной составляющей стандартного отклонения SEP для предсказания каждого аналита в образцах тестируемой партии.

Алгоритмы определения доли и ошибки МЖ в смеси с растительными маслами.

1. По содержаниям ЖК, регламентированным в ГОСТ 32261-2013:

а) идентифицируют МЖ по доле масляной ЖК С4:0. Если МЖ имеется (доля МЖ более 0,5%), то:

* Матричные величины выделены жирным шрифтом.

1 мар 2017 16:45:18

Протокол №235 индентификации молочного жира

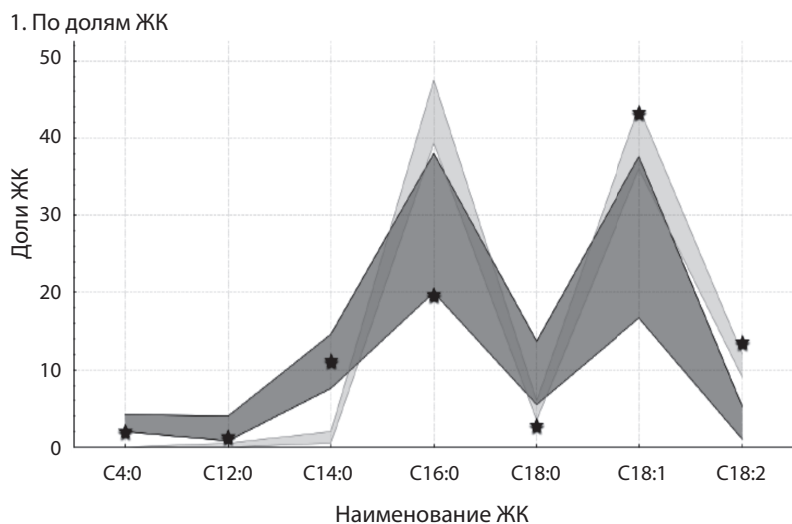


Рис. 4. Эталонные значения долей 7 ЖК в МЖ – в тёмно-серой зоне, те же значения для ПМ (по Codex Alimentarius, 2009, Brussell) – в светло-серой зоне; звёздочки – значения ЖК образца № 85.

б) идентифицируют ПМ по измеренным долям ЖК C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 и C18:1, сравнивая их с эталонными (из Codex Alimentarius, Codex Standard for Named Vegetable Oils (CODEX-STAN 210 – 1999) по Протоколу на рис. 4. Если ПМ имеется (доли ЖК занимают промежуточное положение между эталонными для МЖ и ПМ), то:

в) рассчитывают долю МЖ ($D_{\text{МЖ}}$) и вероятную стандартную ошибку (СО) по долям ЖК, используя уравнения: $D_{\text{МЖ}} = \frac{1}{7} \sum D_{\text{МЖ}i}$ и $CO = 0,14 \sqrt{\sum d_i^2}$, где d_i – возможные вариации доли МЖ в образце по каждой из 7 ЖК. Для этого находят пересечения линии измеренного значения содержания i -й ЖК в образце, во-первых, для определения $D_{\text{МЖ}}$, с линией средней эталонной доли МЖ в смеси с ПМ и, во-вторых, для определения СО, с линиями максимальных и минимальных эталонных значений i -й ЖК при различных соотношениях МЖ и ПМ. При этом следует учитывать, что доля i -й ЖК в образце состоит из вкладов ПМ и МЖ, доля и вариация которых регламентирована ГОСТ Р 53776-2010 «Масло пальмовое рафинированное дезодорированное для пищевой промышленности. Технические условия» и ГОСТ 32261-2013 «Масло сливочное. Технические условия».

2. С помощью калибровки по долям МЖ и ПМ.

Поскольку калибровочные и тестирующие образцы были изготовлены из навесок МЖ, ПМ и оливкового масла, то возможно построение и тестирование моделей для прямого определения долей этих жиров и масел с помощью программы ISCAP.

Результаты. По БИК-спектрам и значениям массовых долей ЖК 4:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:1 и 18:2, долей МЖ и ПМ на 35 стандартах обеих партий (избранные модели представлены

в табл. 2), а по КР-спектрам 35 образцов второй партии (модели по долям МЖ и ПМ представлены в табл. 3) с помощью программы ISCAP построены ПЛС регрессии. Всего построено около 200 калибровочных моделей, которые отличались диапазонами, способами предобработки спектров, составом образцов в калибровочной партии, составом аналитов. Затем модели протестированы 15–16-ю стандартами каждой партии, рассчитаны ошибки определения МЖ (по коэффициентам множественной корреляции, СО и селективности) и выполнено взаимное тестирование моделей образцами другой партии (изготовленной из других исходных материалов). Параметры ПЛС-моделей на БИК-спектрах оптической плотности по результатам тестирования: Raw – необработанные спектры; Rb – удалена общая базовая линия; GSDer – спектры сглажены по Голею–Савицкому и продифференцированы; 2GSDer – спектры дважды сглажены по Голею–Савицкому и продифференцированы; обозначения параметров эффективности приведены ниже в пояснениях к табл. 4.

Затем для партии из 15 случайно выбранных стандартных образцов выполнено сравнение значений доли МЖ моделями на БИК- и КР-спектрах по долям ЖК расчётным методом, описанным в разделе «Материалы и методы», и моделями по долям МЖ и ПМ. Следует отметить, что доля ПМ по данным табл. 3 определяется существенно хуже, чем доля МЖ, что, вероятно, связано с большей вариацией жирнокислотного состава ПМ из различных источников поставки.

В табл. 4 для примера представлены результаты расчёта доли МЖ в образце смеси № 85 по семи значениям долей ЖК, $\sum D_{\text{МЖ}i}/7$.

В образце № 85, например, были определены доли МЖ с помощью калибровки по долям масел (по модели GSDer по БИК-спектрам: $n = 4$ – число латентных переменных ГК; $r^2_p = 0,97$ – коэффициент множественной корреляции; $SEC = 0,8\%$ – случайная компонента среднеквадратичной ошибки). Для образца № 85 получено значение доли МЖ: $D_{\text{МЖ}} = (0,45 \pm 0,005)\%$, что хорошо согласуется со значением доли, полученным по долям 7 ЖК (см. табл. 4), но более достоверно и точно.

Выводы и рекомендации. Показатели моделей на спек-

Таблица 2

Построение и тестирование ПЛС-калибровок

Анализ. вещество	Обработка спектров											
	Raw			Rb			GSDer			2GSDer		
Аналит	n	r^2_p	SEP	n	r^2_p	SEP	n	r^2_p	SEP	n	r^2_p	SEP
C4:0	7	0,82	2	7	0,83	1,7	6	0,91	1,3	6	0,91	1,3
C12:0	7	0,82	2	7	0,83	1,7	6	0,91	1,3	6	0,91	1,3
C14:0	6	0,84	1,8	5	0,84	1,8	5	0,91	1,4	5	0,91	1,4
C16:0	5	0,85	1,6	5	0,87	1,4	5	0,92	0,9	5	0,91	0,9
C18:0	6	0,83	1,6	6	0,83	1,5	5	0,94	1	5	0,91	1
C18:1	5	0,86	1,4	5	0,86	1,4	4	0,95	0,9	5	0,91	0,9
C18:2	7	0,81	1,2	7	0,84	1,4	5	0,91	1	5	0,91	1
МЖ	6	0,89	1,5	4	0,89	1,1	4	0,97	0,8	5	0,91	0,8
ПМ	7	0,86	1,6	6	0,86	1,3	5	0,92	0,9	5	0,91	0,9

Таблица 3

Параметры ПЛС-моделей на КР-спектрах по результатам тестирования: способы обработки спектров: Raw – необработанные, Rb – удаление общей базовой линии, SmDer – сглаживание полиномами и дифференцирование, 2SmDer – двукратное сглаживание полиномами и дифференцирование

Обработка спектров	МЖ			ПМ			ОлМ + ПМ		
	n	r ² _p	SEP	n	r ² _p	SEP	n	r ² _p	SEP
Raw	4	0,94	1,1	6	0,81	1,5	4	0,93	1
Rb	3	0,92	1	4	0,81	1,2	6	0,94	0,8
SmDer	3	0,97	0,9	4	0,82	1	6	0,95	0,8
2 SmDer	3	0,87	0,9	3	0,81	1	6	0,91	0,9

трах КР по долям МЖ–ПМ: $r^2_p = 0,93$; $SEC = 2,5\%$ масс существенно лучше, чем для моделей по долям 7 ЖК: $r^2_p = 0,69$; $SEC = 9,5\%$ масс.

Показатели моделей на БИК-спектрах поглощения по долям МЖ–ПМ: $r^2_p = 0,91$; $SEC = 1\%$ масс – также заметно, хотя и в меньшей степени, лучше, чем для моделей по долям 7 ЖК: $r^2_p = 0,79$; $SEC = 5,4\%$ масс.

Установлена селективность (независимость) определения олеиновой С18:1 ЖК от вариации доли ближайшего аналога – стеариновой С18:0 ЖК на уровне 86% при использовании только длины углеродной цепи и числа двойных связей $C=C$ (по данным отнесения спектров к колебаниям), а при использовании модели по долям МЖ и ПМ, то есть при учёте изомерного различия ТГ – более 96%.

Аналогия свойств моделей на спектрах КР- и БИК-поглощения, при известной чувствительности моделей на спектрах КР к позиционным изомерам, подтверждает наличие корреляции спектров БИК-поглощения с последними. Этот вывод подтверждается также повышением селективности определения олеиновой С18:1 ЖК при учёте различия изомерных форм ПМ и МЖ.

Согласно филогенетической теории общей патологии [21], среди 7 биологических функций *in vivo* афизиологичному влиянию факторов внешней среды в большей мере подвержена биологическая функция трофологии – функция питания. Нарушение биологической функции трофологии является важным фактором в патогенезе метаболических пандемий: метаболической артериальной гипертензии, атеросклероза с атероматозом, метаболического синдрома – патологии независимых от инсулина висцеральных жировых клеток, резистентности к инсулину, ожирении – патологии инсулинозависимых подкожных адипоцитов и неалкогольной жировой болезни печени.

С позиций общей биологии, взрослым, особенно пожи-

Таблица 4

Пример определения доли МЖ по 7 ЖК для образца № 85: Zi – доля (% массе) ЖК; ДiсэМ – средняя эталонная доля ЖК в МЖ; ДiсэП – средняя эталонная доля ЖК в ПМ, $\delta_{сэ} = \text{ДiсэМ} - \text{ДiсэП}$; $\delta = Zi - \text{ДiсэМ}$; $\text{Дмжi} = |Zi - \text{ДiсэМ}| / \delta_{сэ}$.

ЖК	Zi	ДiсэМ	ДiсэП	$\delta_{сэ}$	δ	Дмжi
C4:0	1,8	3	0	3	1,2	0,4
C12:0	1,1	2,2	0,2	2	1,1	0,55
C14:0	10	11	1,2	9,8	1	0,1
C16:0	19	29	42	13	10	0,77
C18:0	8,5	10	5	5	1,5	0,3
C18:1	39	27	39	12	12	1,0
C18:2	1,4	4	10	6	2,6	0,43
S Дмжi/7						0,460 ± 0,025

лым, людям рекомендуется отказаться от потребления сливочного жира и уменьшить в пище содержание продуктов, богатых пальмитиновой НЖК: говядины, сметаны, жирных сыров. Это реальный шаг в профилактике метаболических пандемий (атеросклероз и атероматоз, метаболический синдром, резистентность к инсулину, ожирение). Ещё велика популяция людей, которые при оптимальном количестве пищи длительно сохраняют *in vivo* повышенное количество экзогенной пальмитиновой НЖК в плазме крови в форме незатерифицированной (свободной) ЖК. Это всегда является основой для формирования синдрома инсулинорезистентности,

гиперинсулинемии и условий для потенциального развития сахарного диабета. Описанный же в настоящей и предшествующей работе [22] портативный БИК-спектрометр может быть использован для интенсификации массового оперативного контроля содержания растительных масел и животных жиров в пище пациентов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность канд. тех. наук Е.А. Юровой, зав. лабораторией технического контроля ВНИМИ РАН за организацию хроматографирования партий образцов. Особую благодарность авторы выражают д-ру физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. Центра лазерных исследований РАН А.П. Свиридову за организацию измерения КР-спектров партий образцов.

Финансирование. Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по проекту № 16-02-00277.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-16; 19-20)
см. REFERENCES

1. Титов В.Н. Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов. М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада»; 2008.
17. Орлова Т.И., Уколов А.И., Савельева Е.И., Радилов А.С. Определение свободных и этерифицированных жирных кислот в плазме крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием. *Аналитика и контроль*. 2015; 19(2): 183-8.
18. Рудаков О.Б., Пономарев А.Н., Полянский К.К., Лобарь Ф.В. *Жиры, химический состав и экспертиза качества*. М.: Дели Принт; 2005.
21. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. *Сахарный диабет*. М.: ИНФРА-М; 2014..
22. Калинин А.В., Крашенинников В.Н., Свиридов А.П., Титов В.Н. Определение содержания диагностически значимых жирных кислот и индивидуальных триглицеридов в биологических средах на основе инфракрасной спектроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(11): 13 - 20.

REFERENCES

1. Titov V.N. *Clinical biochemistry of fatty acids, lipids and lipoproteins. [Klinicheskaya biokhimiya zhirnykh kislot, lipidov i lipoproteinov]*. Moscow - Tver': OOO «Izdatel'stvo «Triada»; 2008. (in Russian)
2. Lasa A., Schweiger M., Kotzbeck P., Churruga I., Simón E., Zechner R., Portillo M.P. Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase. *J. Nutr. Biochem.* 2012; 23(4): 379 - 84.
3. Yao M., Lien E.L., Capeding M.R., Fitzgerald M., Ramanujam K., Yuhar R. Effects of term infant formulas containing high sn-2 palmitate with and without oligofructose on stool composition, stool characteristics, and bifidogenicity. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2014; 59(4): 440 - 8.

4. Lopez C., Cauty C., Guyomarc'h F. Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy. Sci. Technol.* 2015; 95(6): 863 - 93.
5. Giammanco A., Cefalu A.B., Noto D., Averna M.R. The pathophysiology of intestinal lipoprotein production. *Front. Physiol.* 2015; 6: 61–70.
6. Sun Y., Neelakantan N., Wu Y., Lote-Oke R., Pan A., van Dam R.M. Palm oil consumption increases LDL cholesterol compared with vegetable oils low in saturated fat in a meta-analysis of clinical trials. *J. Nutr.* 2015; 145(7): 1549 - 58.
7. Bourlieu C., Michalski M.C. Structure-function relationship of the milk fat globule. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2015; 18(2): 118 - 27.
8. Oda O.J., Ofori S., Maduka O. Palm oil and the heart: a review. *World J Cardiol.* 2015; 7(3): 144 - 9.
9. Nowacki J., Lee H.C., Lien R., Cheng S.W., Li S.T., Yao M. et al. Stool fatty acid soaps, stool consistency and gastrointestinal tolerance in term infants fed infant formulas containing high sn-2 palmitate with or without oligofructose: a double-blind, randomized clinical trial. *Nutr J.* 2014; 13: 105 – 11.
10. Bresson S., El Marssi M., Khelifa K. Conformational influences of the polymorphic forms on the C=O and C–H stretching modes of five saturated monoacid triglycerides studied by Raman spectroscopy at various temperatures. *Vibrat. Spectroscopy.* 2006; 40: 263–9.
11. Da Silva E., Bresson S., Rousseau D. Characterization of the three major polymorphic forms and liquid state of tristearin by raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids.* 2009; 113 –9.
12. Motoyama M., Structure and phase characterization of triacylglycerols by raman spectroscopy *Bull NARO. Inst. Livest. Grassl. Sci.* 2012; (12): 19-68.
13. Kalinin A.V., Krashennnikov V.N., Detection of fatty product falsifications using a portable near Infrared spectrometer. EPJ. Web. Conferences. 2017; 132, 02009 DOI:10.1051/epjconf/201713202009.
14. Wold S., Sjostrom M., Eriksson PLS regression: a basic tool of chemometrics, *Chem. Intelligent. Lab. Syst.* 2001; 58(7): 109 – 30.
15. Kalinin A., Krashennnikov V., Sadovskiy S., Yurova E. Determining the composition of proteins in milk using a portable near infrared spectrometer. *J. Near. Infrared. Spectrosc.* 2013; 21(5): 409 - 16.
16. Kalinin A., Tarabukin I., Yurova E. Determination of the milk fat in fat-oil mixture using portable NIR spectrometer. In Proceedings of 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy, la Grande-Motte, France. publ. by France Institut National de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture, part 3: 38 – 45, 2013.
17. Orlova T.I., Ukolov A.I., Savel'eva E.I., Radulov A.S. Determination of free and esterified fatty acids in blood plasma by gas chromatography with mass-selective detection. *Analitika i kontrol'.* 2015; 19(2): 183-8. (in Russian)
18. Rudakov O.B., Ponomarev A.N., Polyanskiy K.K., Lobar' F.V. *Fats, chemical composition and quality examination. [Zhiry, khimicheskij sostav i ekspertiza kachestva].* Moscow: Deli Print; 2005. (in Russian)
19. Cabassi G, Povolo M, Pelizzola V., Monti L., Genorini E. Contarini G. Development of a near infrared method for the quantification of the main classes of fatty acids obtained from raw milk by solvent-free extraction. *J. Near Infrared Spectrosc.* 2013; 21(5): 395-403.
20. Kalinin A., Krashennnikov V., Sadovskiy S., Denisovich E., Yurova E., Calibration models for multi-component quantitative analyses of dairy with the use of two different types of portable near infrared spectrometer. *J. Near. Infrared. Spectr.* 2008; 16(3): 343 – 8.
21. Titov V.N. *Phylogenetic theory of general pathology. The pathogenesis of metabolic pandemics. Diabetes. [Filogenicheskaya teoriya obschey patologii. Patogenez metabolicheskikh pandemiy. Saharniy diabet].* Moscow:INFRA-M.; 2014. (in Russian)
22. Kalinin A.V., Krashennnikov V.N., Sviridov A.P., Titov V.N. Determination of the content of diagnostically significant fatty acids and individual triglycerides in biological media based on infrared spectrometry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2015; 60(11): 13 - 20. (In Russian)

Поступила 23.10.17

Принята к печати 17.01.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.018:577.175.3/5.083-057.36

Кубасов Р.В.¹, Барачевский Ю.Е.¹, Иванов А.М.², Кубасова Е.Д.¹

ГОРМОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ГИПОФИЗ – НАДПОЧЕЧНИКИ У КОМБАТАНТОВ ПРИ КОМАНДИРОВКЕ В «ГОРЯЧИЕ ТОЧКИ»

¹ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 163061, Архангельск;

²ФГБВО ВОУ «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны России, 194044, Санкт-Петербург

Свои профессиональные обязанности сотрудники Министерства внутренних дел России (МВД), как правило, выполняют в экстремальных, а нередко и в чрезвычайных ситуациях. Гипофизарно-надпочечниковая система регуляции вносит основной вклад в обеспечение формирования механизмов компенсации на эти воздействия. Цель работы – изучить изменения содержания адренокортикотропного гормона, кортизола, адреналина и норадреналина у сотрудников МВД, командированных на территории с локальным вооружённым конфликтом (Северный Кавказ) для поддержания правопорядка. Результаты исследования показали, что в течение первых двух месяцев командировки происходит значительное повышение уровня изучаемых гормонов. Это адекватная реакция организма на изменившиеся условия среды обитания. Эти изменения соответствуют основным положениям теории общего адаптационного синдрома. Однако дальнейшее же наблюдение, в динамике командировки, показало наличие признаков дисбаланса секреции гормонов в системе гипофиз – надпочечники. Обнаружено длительно сохраняющееся, до конца командировки, высокое содержание как адренокортикотропного гормона, так и кортизола. В то же время содержание гормонов «быстрого ответа» на экстремальные факторы окружающей среды (адреналин, норадреналин) оказалось таким же высоким, как и в начале командировки. Такие явления приводят к нарушению регуляции межгормональных взаимоотношений, что соответственно является фактором снижения жизненной стрессоустойчивости организма. Предложены основные направления организационно-медицинского характера в рамках мероприятий по обеспечению устойчивости организма к условиям экстремальных воздействий чрезвычайных ситуаций и снижению риска развития патологических состояний.

Ключевые слова: сотрудники правопорядка; экстремальные условия; эндокринная система.

Для корреспонденции: Кубасов Роман Викторович, канд. биол. наук, доц. каф. мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф; e-mail: romanas2001@gmail.com

Для цитирования: Кубасов Р.В., Барачевский Ю.Е., Иванов А.М. Гормональные показатели системы гипофиз-надпочечники у комбатантов при командировке в «горячие точки». Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(5): 267-272. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-267-272>

Kubasov R.V.¹, Barachevsky Yu.E.¹, Ivanov A.M.², Kubasova E.D.¹

THE HORMONAL INDICES OF HYPOPHYSIS-ADRENAL GLANDS SYSTEM IN COMBATANTS DURING MISSIONS TO "TROUBLE SPOTS"

¹The State Budget Educational Institution of Higher Professional Education "The Northern State Medical University" of Minzdrav of Russia, 163061, Arkhangelsk, Russia

²The Federal State Budget Military Educational Institution of Higher Education "The S.M. Kirov Military Medical Academy" of the Ministry of Defense of Russia, 194044, St. Petersburg, Russia

The officials of the Interior Ministry of Russia usually perform their duties in extreme and quite often emergency conditions. The hypophysis-adrenal glands system of regulation mainly contributes into supporting formation of mechanisms of compensation of these exposures. The purpose of study is to analyze alterations of content of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, adrenaline and noradrenaline in officials of the Interior Ministry sent on a mission to territories with local military conflict (the Northern Caucasus) to support public order. The study results demonstrated that during first two months of mission a significant increasing of level of analyzed hormones occurs. This is a proper reaction to changed conditions of environment. These alterations correspond to main propositions of the general adaptation syndrome theory. However, further observation in dynamics of mission established presence of signs of imbalance of secretion of hormones in hypophysis-adrenal glands system. The long-lasting conserving high content of both of adrenocorticotrophic hormone and cortisol till the end of mission was established. At the same time, content of hormones of "fast response" to extreme factors of environment (adrenaline, noradrenaline) occurred to be as higher as at the beginning of mission. Such occurrences result in disorder of regulation of inter hormonal relationships that correspondingly is a factor of decreasing of vital stress resistance of organism. The main directions of organizational medical character are proposed within th framework of activities supporting resistance of organism to conditions of extreme impact of emergency situations and decreasing risk of development of pathological conditions.

Key words: law and order officials; extreme conditions; endocrine system.

For citation: Kubasov R.V., Barachevsky Yu.E., Ivanov A.M., Kubasova E.D. The hormonal indices of hypophysis-adrenal glands system in combatants during missions to "trouble spots". *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(5): 267-272. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-267-272>

For correspondence: Kubasov R.V., candidate of biological sciences, associate professor of the chair of mobilization training of health care and disaster medicine of the State Budget Educational Institution of Higher Professional Education "The Northern State Medical University", e-mail: romanas2001@gmail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.02.2018
Accepted 21.02.2018

Введение. Современная жизнь происходит в условиях развития и углубления целого ряда политических, идеологических, религиозных, экономических и прочих конфликтов и кризисов [1–5].

Анализ тенденций развития крупномасштабных чрезвычайных ситуаций (ЧС) различного характера показал, что в среднесрочной перспективе они, с учётом их воздействия на человеческий потенциал и условия безопасной жизнедеятельности, остаются одним из важнейших препятствий стабильного и долгосрочного экономического роста [6–9].

Профессиональная деятельность лиц, участвующих в ликвидации последствий ЧС, протекает в экстремальных условиях. Они способствуют возникновению нарушений здоровья, приводящих к снижению качества деятельности вплоть до невозможности её дальнейшего продолжения [10–13].

Согласно современным взглядам на этиологию и патогенез нарушений состояния здоровья вследствие воздействия экстремальных факторов, напряжение регуляторных систем и последующие дизадаптивные реакции опосредуются психосоматическими проявлениями. В ответ на длительное психологическое перенапряжение в организме возникают нарушения функционирования всех регуляторных систем (дисфункция нейроиммунно-эндокринного комплекса). В частности, в эндокринном звене происходит разбалансировка физиологических связей в системе централь-

ные – периферические железы внутренней секреции [14–17].

В связи с этим целью исследования явилось изучение изменений секреции гормонов надпочечников у сотрудников органов внутренних дел, выполняющих служебные функции по обеспечению правопорядка в экстремальных условиях длительных командировок на территории России, осложнённых боевой обстановкой.

Материал и методы. Обследованы сотрудники Управления Министерства внутренних дел (УМВД) по Архангельской области – 48 мужчин, командированных в районы Северного Кавказа для обеспечения правопорядка (Чечено-Ингушская Республика), средний возраст $28,28 \pm 0,51$ года. Продолжительность командировки 4 мес.

Динамическое исследование проводилось перед командировкой, на 14-й день после прибытия в зону выполнения служебных обязанностей, через 1, 2 мес и по её завершении (4 мес).

В сыворотке крови определено содержание адренокортикотропного гормона (АКТГ) методом радиоиммунного анализа (коммерческий набор Cis-bio International, Франция) и кортизола методом иммуноферментного анализа (коммерческий набор Monobind Inc., США).

В моче методом газовой хроматографии в сочетании с массе-спектрометрическим детектором определено содержание адреналина и норадrenalина.

Статистическая обработка полученных результа-

тов, оценка распределения показателей, сравнительный анализ выборок проведены с помощью компьютерного пакета прикладных программ SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., США).

Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался за 0,05. При $0,1 < p > 0,05$ уровень значимости расценивался как тенденция к различиям между сравниваемыми группами.

Для проверки наличия нормального распределения использованы коэффициенты асимметрии и эксцесса, квантильные диаграммы и тест Шапиро–Уилка, которые показали отклонение от нормального распределения в выборках. Для сравнительного анализа использовался критерий Вилкоксона.

Результаты. Анализ полученных результатов показал наличие статистически значимых изменений содержания исследуемых показателей у комбатантов в динамике командировки на территории Северного Кавказа. Однако при этом их уровень не выходил за пределы установленных физиологических норм.

Средний уровень АКТГ по сравнению с исходным (перед командировкой $20,07 \pm 3,20$ пг/мл) через 2 нед увеличился более чем в 2 раза ($55,80 \pm 15,68$ пг/мл; $p < 0,001$), а к концу 1-го месяца – в 4 раза, до $86,43 \pm 17,56$ пг/мл; $p < 0,001$ (рис. 1). К концу 2-го месяца отмечалось дальнейшее повышение его уровня, но менее значительное ($96,60 \pm 17,18$ пг/мл; $p = 0,005$ в сравнении с предыдущим этапом исследования). К моменту завершения командировки средний уровень АКТГ значительно снизился ($55,37 \pm 10,70$ пг/мл; $p < 0,001$), однако его уровень оставался высоким в сравнении с исходным, до командировки ($p < 0,001$).

Выявленные изменения содержания кортизола имели отличающуюся от АКТГ динамику (рис. 2). В частности, к концу 2-й недели пребывания в командировке средний уровень кортизола (как и АКТГ) значительно увеличился ($489,25 \pm 112,46$ нмоль/л) в сравнении с таковым перед отъездом на Северный Кавказ ($404,81 \pm 124,54$ нмоль/л; $p = 0,002$). Однако в дальнейшем (в отличие от АКТГ) отмечено снижение содержания кортизола к концу 1-го месяца до $426,80 \pm 102,54$ нмоль/л ($p = 0,006$, в сравнении с предыдущим этапом), а к концу 2-го месяца до $407,82 \pm 101,66$ нмоль/л ($p < 0,001$, также в сравнении со 2-й неделей). При этом сопоставление средних значений кортизола через 1 и 2 мес командировки с исходным уровнем значимых различий не выявило ($p > 0,05$). К моменту окончания командировки у обследованных вновь выявлено повышение концентрации кортизола в крови до уровня, близкого к таковому после первых двух недель ($471,16 \pm 117,78$ нмоль/л; $p = 0,44$), но в то же время значимо превышающей таковую при исходном состоянии, через 1 и 2 мес пребывания на Северном Кавказе ($p = 0,05–0,003$).

Динамика содержания катехоламинов у обследованных сотрудников правоохранительных органов во время командировки в горячие точки во многом сходна с изменениями АКТГ, однако статистический уровень значимости различий средних значений меньший (рис. 3).

Экскреция адреналина с мочой через 2 нед от начала командировки у комбатантов увеличилась в 1,5 раза, с $83,01 \pm 18,63$ до $117,12 \pm 55,68$ нмоль/сут; $p < 0,001$. В дальнейшем отмечено сохранение этого показателя на том же уровне в течение 1-го месяца ($122,80 \pm 67,56$ нмоль/сут; $p < 0,001$ в сравнении с исходным уровнем и $p = 0,65$ в сравнении с показателем на 2-й

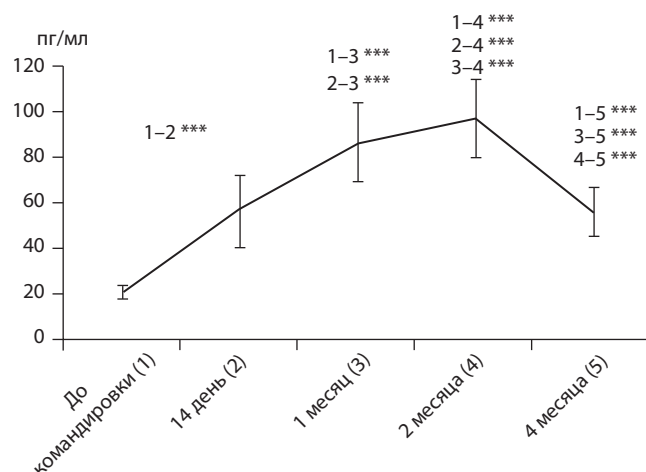


Рис. 1. Изменения содержания АКТГ в сыворотке крови у комбатантов в динамике командировки в горячие точки ($M \pm SD$). ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

неделе командировки). К концу 2-го месяца пребывания в командировке вновь наблюдалось существенное повышение концентрации в моче адреналина ($161,55 \pm 77,18$ нмоль/сут; $p = 0,002$ в сравнении со 2-й неделей и $p = 0,02$ при сравнении с 1-м месяцем). К моменту завершения командировки содержание адреналина значительно снизилось ($91,32 \pm 57,62$ нмоль/сут; $p = 0,03–0,001$ в сравнении с предыдущими периодами), но по-прежнему превышало исходный уровень ($p = 0,04$).

При анализе изменений экскреции норадреналина с мочой через 2 нед от начала командировки отмечено резкое увеличение этого показателя (с $160,35 \pm 38,85$ до $229,30 \pm 102,34$ нмоль/сут; $p < 0,001$). В дальнейшем, к концу 1-го месяца, экскреция норадреналина (в отличие от адреналина) существенно повысилась (до $275,68 \pm 121,58$ нмоль/сут; $p = 0,05$, в сравнении со 2-й неделей) и сохранялась практически на том же уровне вплоть до 2-го месяца пребывания в зоне командировки ($268,32 \pm 111,67$ нмоль/сут;

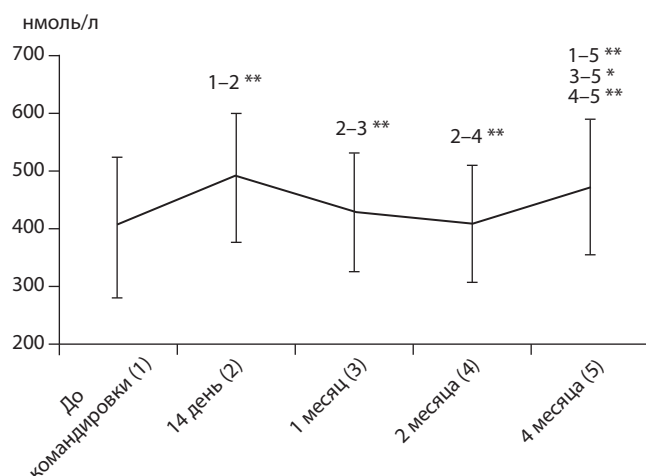


Рис. 2. Изменения содержания кортизола в сыворотке крови у комбатантов в динамике командировки в горячие точки ($M \pm SD$).

Здесь и на рис.3: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

БИОХИМИЯ

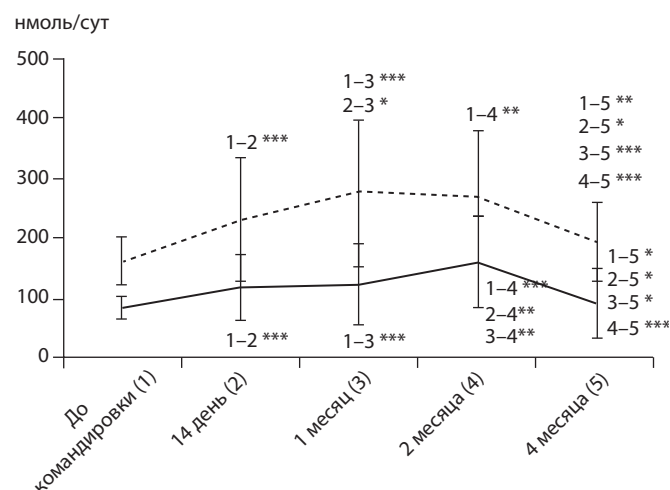


Рис. 3. Изменения содержания адреналина и норадреналина в моче у комбатантов в динамике командировки в горячие точки ($M \pm SD$).

Сплошная линия – адреналин, пунктирная – норадреналин.

$p = 0,07$ в сравнении со 2-й неделей). К концу командировки уровень норадреналина снизился до $193,6 \pm 66,05$ нмоль/сут, но превышал исходный ($p = 0,003$).

Обсуждение. Как известно, гормоны надпочечников играют ведущую роль в формировании ответа адаптации организма к экстремальным факторам внешней среды [18]. При чрезмерном, продолжительном воздействии повреждающих факторов окружающей среды возникают нарушения регуляции функционирования надпочечников, приводящие к истощению резервных возможностей организма (дистрессовое состояние). Основные проявления его – гиперсекреция биологически активных веществ, возникновение резистентности клеток-мишеней к ним, повреждение механизма обратной связи в регуляции [19].

АКТГ является одним из ключевых звеньев регуляции секреции глюкокортикоидов, важнейшим представителем которых является кортизол. Он оказывает активирующее воздействие на клетки коркового слоя надпочечников, непосредственно синтезирующие и секретирующие глюкокортикоиды. Соответственно при воздействии экстремальных факторов его уровень в крови значительно возрастает [20].

Глюкокортикоиды при стрессовых ситуациях активируют в организме процессы долговременной адаптации. Кортизол при этом играет ключевую модулирующую роль, приводя организм в наиболее адекватное развивающейся ситуации состояние путём трансформации обменных и энергетических процессов. Метаболический эффект кортизола заключается в подготовке организма к мобилизации энергетических ресурсов. Он изменяет процессы углеводного, липидного, белкового и электролитного обмена. Помимо этого кортизол является регулятором развития и дифференцирования клеток, изменения генной активности, оказывает модулирующее действие на иммунитет и на многие специфические реакции, развивающиеся в ответ на действие экстремальных раздражителей [21–23].

Исследования показали, что у комбатантов в течение первых дней после получения приказа о командировке появляются лабораторные маркёры аллостаза: повышенные уровни АКТГ, кортизола. При этом максимальных

значений они достигают к концу 2-й недели. К концу командировки эти показатели снижаются, но остаются выше исходного уровня, что свидетельствует о сохранении признаков нарушения гомеостаза организма. Предполагается также, что сохраняющееся более полугодия увеличение уровня АКТГ, кортизола и катехоламинов у комбатантов предопределяет запуск патогенетических механизмов развития посттравматических стрессовых расстройств [24].

В нашем исследовании уровень АКТГ в течение первых двух месяцев командировки стабильно увеличивался. Однако к моменту завершения миссии этот показатель снизился, но в 2 раза превышал исходный уровень. Что касается динамики кортизола, то, несмотря на резкое увеличение его концентрации в первые 2 нед, в последующие 2 мес отмечено снижение этого показателя в крови до исходных уровней, несмотря на продолжающееся увеличение содержания АКТГ. Такой гормональный дисбаланс может свидетельствовать о первых признаках нарушения регуляции секреции гормонов в системе гипоталамус – надпочечники. К концу же командировки выявлен новый резкий подъём уровня кортизола, сопоставимый с первыми двумя неделями командировки, что, на наш взгляд, предопределяет срыв адаптационного процесса.

Катехоламины (адреналин, норадреналин), образующиеся в мозговом слое надпочечников, формируют процессы кратковременной (срочной) адаптации. Они дают катаболический эффект, влияя практически на все виды обмена веществ. Их секреция резко повышается при стрессовых состояниях и пограничных ситуациях. Несмотря на общий физиологический эффект, клетками мишени и, соответственно, механизм действия для адреналина и норадреналина различны. Так, адреналин, называемый гормоном страха, функционально повышает выносливость организма на начальном этапе стресса в кратчайшее время. Действие норадреналина (гормон ярости) начинается следом за адреналином. Выброс его в кровь сопровождается реакцией агрессии, он способствует увеличению мышечной силы, а также усиливает эффекторное влияние адреналина [25].

В нашем исследовании уже в первые 2 нед после попадания в условия, близкие к боевым, у комбатантов отмечено значительное увеличение средних уровней как адреналина, так и норадреналина. Такую реакцию можно рассматривать как естественный ход адаптационного процесса к изменившимся условиям. Далее, в течение двух месяцев содержание адреналина неуклонно возрастало и только к концу командировки снизилось. Однако при этом его уровень оставался ещё значительно выше по сравнению с исходным (до командировки). Такую динамику можно расценивать как возможное замедление хода адаптационного процесса и первые признаки возникновения дистрессового состояния. Что касается норадреналина, то в течение 1-го месяца командировки отмечено значительное повышение его уровня, причём довольно длительное время сохраняющееся. С физиологической стороны – это нормальная, естественная реакция организма, направленная на повышение способностей к выживанию в стрессовой ситуации.

Схожие результаты получены другими исследователями. Так, у военнослужащих срочной службы прослеживается определенная динамика уровня катехоламинов, свойственная развитию адаптационного процесса, а в некоторых случаях появлению признаков дистресса.

При этом гормональный дисбаланс может сохраняться до 6 мес и более [26].

Заключение. У комбатантов в динамике командировки в горячие точки секреторная функция надпочечников изменяется в соответствии с принципами теории общего адаптационного синдрома. В первые недели после попадания в условия, приближенные к боевым, происходит резкое увеличение секреторной активности, как мозгового, так и коркового слоя надпочечников. К моменту окончания командировки наблюдаются признаки дисфункции в системе регуляции гипофиз – надпочечники, которые приводят к нарушению межсистемных взаимодействий в организме и снижению его стрессоустойчивости.

Дальнейшее изучение интегральных взглядов на общность регуляторных систем как на центральном, так и на периферическом уровне позволит разработать меры по повышению сопротивляемости и жизнестойкости организма в условиях воздействия экстремальных факторов чрезвычайно опасных ситуаций.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карякин В.В. Современные кризисы и конфликты: особенности, сценарии развития и предотвращение. *Проблемы национальной стратегии*. 2014; 4: 136-51.
2. Манойло А.В. Геополитическая картина современного мира. *Национальная безопасность / nota bene*. 2013; 5: 149-55.
3. Hamdan F. Intensive and extensive disaster risk drivers and interactions with recent trends in the global political economy, with special emphasis on rentier states. *International Journal of Disaster Risk Reduction*. 2015; 14: 273-89.
4. Mitchell M.L., McKinnon L., Aitken L.M., Weber S., Birgan S., Sykes S. Enhancing disaster preparedness of specialty nurses on a national scale. *Disaster Prevention and Management*. 2016; 1: 11-26.
5. Sidorov P.I. Mental terrorism of hybrid wars and defense synergetic. In: Hoges K.F., ed. *New Developments in Surveillance Systems and National Security*. New York; 2015: 137-61.
6. Гончаров С.Ф., Сахно И.И., Черняк С.И., Баранова Н.Н., Нагавкин А.Н. Роль дополнительного профессионального образования в подготовке руководителей здравоохранения по вопросам организации и оказания медицинской помощи пострадавшим в чрезвычайных ситуациях. *Медицина катастроф*. 2015; 1: 53-6.
7. Журавель В.П. 2008-2012 годы: состояние и тенденции борьбы с терроризмом в России. *Международные отношения*. 2013; 1: 86-91.
8. Rogers P., Burnside-Lawry J., Dragisic, J., Mills C. Collaboration and communication: Building a research agenda and way of working towards community disaster resilience. *Disaster Prevention and Management*. 2016; 1: 75-90.
9. Tsai J., Wachter J.A. Disaster Risk and Its Implications for Asset Pricing (Review). *Annual Review of Financial Economics*. 2015; 7: 219-52.
10. Фалеев М.И., Макиев Ю.Д. Сфера социально-экономического развития Российской Федерации, необходимая для защиты от чрезвычайных ситуаций. *Стратегия гражданской защиты: проблемы и исследования*. 2015; 2: 11-21.
11. Цыган В.Н. Адаптация к военно-профессиональной деятельности. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2012; 1: 72-82.
12. Bourke J. The complexity of medicine and war. *The Lancet*. 2009; 9658: 113-4.
13. Brisebois R., Hennecke P., Kao R., McAlister V., Po J., Stiegelmar R. et al. Canadian Forces Health Services Research Consortium. The Role 3 Multinational Medical Unit at Kandahar Airfield 2005-2010. *Can. J. Surg*. 2011; 6: 124-9.

14. Панков Ю.А. Революционные перемены в эндокринологии. *Проблемы эндокринологии*. 2005; 6: 3-8.
15. Попкова В.А. Динамика показателей эндокринного профиля рабочих целлюлозно-бумажного комбината. *Медицина труда и промышленная экология*. 2017; 3: 54-9.
16. Новицкий А.А., Алексанин С.С., Дударенко С.В. Механизм развития патологии внутренних органов в условиях экологического и профессионального перенапряжения регуляторных систем организма человека. *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*. 2010; 1: 5-9.
17. Федина Р.Г., Потеряева Е.Л., Бондарь А.Н. Экологический стресс-фактор, влияющий на гормонально-метаболические характеристики сыворотки крови у мужчин. *Экология человека*. 2009; 7: 33-6.
18. Selye H. *Stress without distress*. Philadelphia, USA: Lippincott; 1974.
19. Орбак З. Резистентность к глюкокортикоидам. (Обзор). *Биохимия*. 2006; 10: 1328-37.
20. Rhodes M.E. Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH). In: G. Fink eds. *Encyclopedia of Stress (Second Edition)*. USA: Academic Press; 2007: 69-72.
21. Shimojo M., Miyachi Y. Roles of glucocorticoid for the regulation of lipid metabolism. *Nippon Rinsho*. 2001; Suppl. 2: 417-20.
22. Sun B., Fujiwara K., Adachi S., Inoue K. Physiological roles of prolactin-releasing peptide. *Regulatory Peptides*. – 2005; 1-2: 27-33.
23. Власова О.С., Бичкаева Ф.А., Третьякова Т.В. Роль жирных кислот, водорастворимых витаминов, кальция, фосфора в обеспечении углеводного обмена у юношеского населения двух разных климатогеографических регионов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 4: 204-9.
24. Yehuda R. Current status of cortisol findings in post-traumatic stress disorder / R. Yehuda. *Psychiatric Clinics of North America*. 2002; 2: 341-68.
25. Emerson A.J., Kappenman D.P., Ronan P.J., Renner K.J., Summers C.H. Stress induces rapid changes in serotonergic activity: restraint and exertion. *Behav Brain Res*. 2000; 1-2: 83-92.
26. Андрюков Б.Г., Зеренков П.А., Половов С.Ф. Оценка стрессоустойчивости новобранцев в первые месяцы службы. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2006; 1: 449.

REFERENCES

1. Karyakin V.V. Modern crises and conflicts: features, scenarios and prevention. *Problemy natsional'noy strategii*. 2014; 4: 136-51. (in Russian)
2. Manoylo A.V. Modern word geopolitics. *Natsional'naya bezopasnost' / nota bene*. 2013; 5: 149-55. (in Russian)
3. Hamdan F. Intensive and extensive disaster risk drivers and interactions with recent trends in the global political economy, with special emphasis on rentier states. *International Journal of Disaster Risk Reduction*. 2015; 14: 273-89.
4. Mitchell M.L., McKinnon L., Aitken L.M., Weber S., Birgan S., Sykes S. Enhancing disaster preparedness of specialty nurses on a national scale. *Disaster Prevention and Management*. 2016; 1: 11-26.
5. Sidorov P.I. Mental terrorism of hybrid wars and defense synergetic. In: Hoges K.F., ed. *New Developments in Surveillance Systems and National Security*. New York; 2015: 137-61.
6. Goncharov S.F., Sakhno I.I., Chernyak S.I., Baranova N.N., Nagavkin A.N. Role of Further Vocational Education in Training of Leading Health Cadres in Issues of Organization and Delivery of Medical Care to Victims in Emergency Situations. *Meditina katastrof*. 2015; 1: 53-6. (in Russian)
7. Zhuravel V.P. Current state of affairs and tendencies in fighting terrorism in Russia in 2008-2012. *International relations*. 2013; 1: 86-91. (in Russian)
8. Rogers P., Burnside-Lawry J., Dragisic, J., Mills, C. Collaboration and communication: Building a research agenda and way of working towards community disaster resilience. *Disaster Prevention and Management*. 2016; 1: 75-90.
9. Tsai J., Wachter J.A. Disaster Risk and Its Implications for Asset

- Pricing (Review). *Annual Review of Financial Economics*. 2015; 7: 219-52.
10. Faleev M.I., Makiev Yu.D. The socio-economic development of the Russian Federation, necessary for protection from emergency situations. *Strategiya grazhdanskoj zashchity: problemy i issledovaniya*. 2015; 2: 11-21. (in Russian)
 11. Tsygan V.N. Adaptation to military professional work. *Rossiiskij fiziologicheskij zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2012; 1: 72-82. (in Russian)
 12. Bourke J. The complexity of medicine and war. *The Lancet*. 2009; 9658: 113-4.
 13. Brisebois R., Hennecke P., Kao R., McAlister V., Po J., Stiegelmar R. et al. Canadian Forces Health Services Research Consortium. The Role 3 Multinational Medical Unit at Kandahar Airfield 2005-2010. *Can. J. Surg.* 2011; 6: 124-9.
 14. Pankov Yu.A. Revolutionary changes in endocrinology. *Problemy endokrinologii*. 2005; 6: 3-8. (in Russian)
 15. Popkova V.A. Changes in endocrine profile of workers in pulp and paper plant. *Meditcina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2017; 3: 54-9. (in Russian)
 16. Novitskiy A.A., Aleksanin S.S., Dudarenko S.V. The mechanism of development of pathology of internal organs in conditions of ecological and professional overstrain of human regulatory systems. *Mediko-biologicheskie i sotsial'no-psihologicheskie problemy bezopasnosti v chrezvychainykh situatsiyakh*. 2010; 1: 5-9. (in Russian)
 17. Fedina R.G., Poteryaeva Ye.L., Bondar A.N. Ecological stress as a factor influencing hormone-metabolic characteristics of blood serum of men. *Ekologiya cheloveka*. 2009; 7: 33-6. (in Russian)
 18. Selye H. *Stress without distress*. Philadelphia, USA: Lippincott; 1974.
 19. Orbak Z. Glucocorticoid Resistance (review). *Biokhimiya*. 2006; 10: 1328-37. (in Russian)
 20. Rhodes M.E. Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH). In: G. Fink eds. *Encyclopedia of Stress (Second Edition)*. USA: Academic Press; 2007: 69-72.
 21. Shimojo M., Miyachi Y. Roles of glucocorticoid for the regulation of lipid metabolism. *Nippon Rinsho*. 2001; Suppl. 2: 417-20.
 22. Sun B., Fujiwara K., Adachi S., Inoue K. Physiological roles of prolactin-releasing peptide. *Regulatory Peptides*. 2005; 1-2: 27-33.
 23. Vlasova O.S., Bichkaieva F.A., Tret'yakova T.V. The role of fatty acids, water-soluble vitamins, calcium, phosphorus in maintaining carbohydrate metabolism in youth population of two different climatic geographic regions. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 4: 204-9. (in Russian)
 24. Yehuda R. Current status of cortisol findings in post-traumatic stress disorder. *Psychiatric Clinics of North America*. 2002; 2: 341-68.
 25. Emerson A.J., Kappenman D.P., Ronan P.J., Renner K.J., Summers C.H. Stress induces rapid changes in serotonergic activity: restraint and exertion. *Behav. Brain Res*. 2000; 1-2: 83-92.
 26. Andryukov B.G., Zerenkov P.A., Polovov S.F. Stress-resistance estimation of new recruits in the first months of service. *Vestnik Rossiyskoj voenno-meditsinskoj akademii*. 2006; 1: 449. (in Russian)

Поступила 17.02.18

Принята к печати 21.02.18

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.126-002-018.1-008.9-074

Бахарева Ю.С.¹, Потеряева О.Н.², Чапаева Н.Н.³, Щербакова Л.В.¹

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И РЕАКТАНТОВ ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ЭНДОКАРДИТАМИ

¹«Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» - филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения РАН», 630089, Новосибирск, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биохимии», 630117, Новосибирск, Россия;

³ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 630090, Новосибирск, Россия

Цель исследования: определить и сравнить концентрацию острофазных показателей, суммарную активность матриксных металлопротеиназ-2, -7 (ММП-2, ММП-7) сыворотки крови у пациентов с вегетациями на клапанном аппарате сердца инфекционной и неинфекционной природы; провести корреляционный анализ между этими показателями; оценить преимущества метода определения суммарной активности ММП-2 и ММП-7 у пациентов с эндокардитами разной этиологии. Обследовано 175 пациентов, которых разделили на две группы: 1-я включала 81 пациента с неинфекционным эндокардитом; 2-я – 94 пациента с инфекционным эндокардитом. Активность ММП-2 и ММП-7 определяли с использованием флуоресцентного субстрата, специфического по отношению к ММП-2 и ММП-7. Показано значительное повышение активности ММП-2 и ММП-7 в сыворотке крови больных с синдромом вегетаций по сравнению с активностью ферментов в крови здоровых лиц (контрольная группа). В группе с неинфекционным эндокардитом активность ММП-2, ММП-7 составила $84,10 \pm 12,37$; в группе с инфекционным эндокардитом – $227,30 \pm 44,70$; в контрольной группе – $4,16 \pm 2,28$ мкмоль МСА/л в час ($p < 0,05$). Не выявлено достоверной разницы между эндокардитами различной природы. Наблюдалась корреляция между активностью матриксных металлопротеиназ и реактантами острой фазы воспаления.

Ключевые слова: неинфекционный и инфекционный эндокардит; матриксные металлопротеиназы; реактанты воспаления.

Для цитирования: Бахарева Ю.С., Потеряева О.Н., Чапаева Н.Н., Щербакова Л.В. Исследование активности матриксных металлопротеиназ и реактантов воспаления у пациентов с эндокардитами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (5):272-276

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-272-276>

Bakhareva Yu.S.¹, Poteryaeva O.N.², Chapaeva N.N.³, Scherbakova L.V.¹

THE STUDY OF ACTIVITY OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND REACTANTS OF INFLAMMATION IN PATIENTS WITH ENDOCARDITIS

Для корреспонденции: Бахарева Юлия Сергеевна, аспирант; e-mail: 8578511@inbox.ru

¹"The Research Institute of Therapy and Preventive Medicine"-The Branch of The Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center "The Institute of Cytology and Genetics" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", 630089, Novosibirsk, Russia

²The Federal State Budget Scientific Institution "The Research Institute of Biochemistry", 630117, Novosibirsk, Russia

³The State Budget Educational Institution of Higher Professional Education "The Novosibirsk State Medical University" of Minzdrav of Russia, 630090, Novosibirsk, Russia

The purpose of study is to establish and compare concentration of acute-phase indices, total activity of matrix metalloproteinases-2, -7 (MMP-2, MMP-7) of blood serum in patients with vegetations on heart valvular apparatus of infectious and noninfectious nature; to apply a correlation analysis between these indices; to evaluate advantages of technique of detection of total activity of MMP-2 and MMP-7 in patients with endocarditis of various etiology. The sampling consisted of 175 examined patients separated on two groups. The first group included 81 patients with noninfectious endocarditis; the second group included 94 patients with infectious endocarditis. The activity of MMP-2 and MMP-7 was detected using fluorescent substrate, specific to MMP-2 and MMP-7. The significant increasing of activity of MMP-2 and MMP-7 in blood serum of patients with vegetation syndrome as compared with activity of enzymes in blood of healthy individuals (control group). In the group with noninfectious endocarditis activity of MMP-2 and MMP-7 made up to $84,10 \pm 12,37$; in the group with infectious endocarditis - $227,30 \pm 44,70$; in the control group - $4,16 \pm 2,28$ mkmol/MCA/l per hour ($p < 0,05$). No reliable difference between endocarditis of various nature was established. The correlation was observed between activity of matrix metalloproteinases and reactants of acute phase of inflammation.

Key words: noninfectious and infectious endocarditis; matrix metalloproteinases; reactants of inflammation.

For citation: Bakhareva Yu.S., Poteryaeva O.N., Chapaeva N.N., Scherbakova L.V. The study of activity of matrix metalloproteinases and reactants of inflammation in patients with endocarditis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostic)* 2018; 63(5): 272-276. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-272-276>

For correspondence: Bakhareva Yu.S., post-graduate student of the Research Institute of Therapy and Preventive Medicine"-The Branch of The Federal State Budget Scientific Institution "The Federal Research Center "The Institute of Cytology and Genetics" of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences", e-mail: 8578511@inbox.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 24.01.2018
Accepted 01.02.2018

Профилактика, диагностика и лечение эндокардитов по-прежнему остаются серьёзной проблемой в клинической практике врача [1]. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и реактанты острой фазы, в частности такие, как и С-реактивный белок (СРБ), традиционно используются в качестве маркеров воспаления и играют потенциальную роль в дифференциальной диагностике инфекционного и неинфекционного эндокардита [2].

К настоящему времени установлено, что структурно-функциональная организация внеклеточного матрикса не только в значительной мере определяет характер пространственной кардиоваскулярной цитоархитектоники, но и обеспечивает и регулирует межклеточное взаимодействие [3]. В связи с этим на протяжении нескольких последних десятилетий продолжает повышаться интерес к матриксным металлопротеиназам (ММП) – клеточным ферментам, вовлекающим внеклеточный матрикс в процессы структурно-функционального ремоделирования, чаще всего путём деградации цепей коллагена. ММП относятся к семейству Zn^{2+} - и Ca^{2+} -зависимых эндопептидаз, участвующих в ремоделировании соединительной ткани посредством разрушения её органических компонентов при физиологических значениях pH. Все металлопротеиназы обладают относительной субстратной специфичностью: представители подсемейства коллагеназ главным образом ответственны за деградацию коллагена I, II и III типов, желатиназы и стромелизины расщепляют коллаген IV и V типов, а также эластин, фибронектин, ламинин и желатин. Субстратами для ММП могут быть нематричные компоненты: плазминоген, фибрин, фибронектин, казеин, кор-протеин, предшественники цитокинов. ММП-8, -12, -13, -14 инактивируют фактор свертывания XII, а ММП-1, -2, -3, -9 – интерлейкин IL-1 β .

Активация ММП-7 в эпителиальных клетках в от-

вет на бактериальное воздействие представляет собой регулируемый процесс, физиологически направленный на удаление патологического агента, и сопровождается повышением синтеза ММП-7 [4]. ММП-2 (желатиназа) прежде всего экспрессируется в мезенхимальных клетках (главным образом в фибробластах) в период развития и регенерации ткани, синтезируется нейтрофилами, макрофагами и моноцитами. ММП-2 расщепляет моноцитарный хемотаксический белок-3, что приводит к уменьшению воспаления. Становится всё более и более очевидным, что ни одна ММП не может быть однозначно помечена как «хорошая» или «плохая» при рассмотрении воспалительного процесса [5].

Цель исследования – определить и сравнить концентрацию острофазных показателей, суммарную активность ММП-2 и ММП-7 сыворотки крови у пациентов с вегетациями на клапанном аппарате сердца инфекционной и неинфекционной природы, провести корреляционный анализ между этими показателями, оценить преимущества метода определения суммарной активности ММП-2 и ММП-7 у пациентов с эндокардитами разной этиологии.

Материал и методы. Сыворотка крови получена у больных, проходивших обследование и лечение в условиях ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница № 34» (ГБУЗ НСО ГКБ № 34). Всеми участниками исследования подписано информированное согласие. Исследование выполнено в соответствии с этическими стандартами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» и стандартами надлежащей клинической практики. Протокол исследования одобрен этическими комитетами ГБУЗ НСО ГКБ № 34, «НИИ терапии и профилактической медицины», Новосибирск.

Всего обследовано 175 пациентов, которых разделили на две группы. В 1-ю группу включили 81 пациента с неинфекционным эндокардитом: 40 (49,4%) мужчин и 41 (50,6%) женщину. Средний возраст пациентов на момент обследования составил $43,0 \pm 13,9$ года. Во 2-ю группу вошли 94 пациента с инфекционным эндокардитом, из них 76 пациентов с первичным эндокардитом и 18 с вторичным эндокардитом, средний возраст больных на момент обследования составил $38,0 \pm 12,5$ и 41 ± 16 лет соответственно. В группе инфекционного эндокардита большинство составили лица молодого и среднего возраста. По гендерному признаку в группе пациентов с НИЭ распределение оказалось в равном процентном соотношении, в группе с ИЭ значительно преобладали мужчины ($p = 0,001$). Для группы контроля обследовали 25 условно здоровых человек, сопоставимых по возрасту и полу. Пациенты контрольной группы не имели клапанной патологии, признаков соединительнотканной дисплазии. Пациентов с недавно перенесёнными острыми состояниями (травма, полихимиотерапия, недавнее хирургическое вмешательство), а также беременных исключили из исследования.

Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, взятая утром до приёма пищи. Всем больным выполняли лабораторное исследование в соответствии с алгоритмом лабораторной диагностики: определение уровня гемоглобина, гематокрита, лимфоцитов и лейкоцитов, скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Анализ проводили на образцах крови, стабилизированных антикоагулянтном в специальных вакуумных пробирках. Использовались рутинные методы подсчёта числа клеток и исследования гемограммы. Последнее выполнялось на гематологическом анализаторе BC-5800 Mindray (Китай) в соответствии с инструкцией к используемому анализатору и реагентам. Биохимическое исследование сыворотки крови проводили с определением концентрации С-реактивного белка (СРБ) и фибриногена на автоматическом биохимическом анализаторе Cobas 6000 Hitachi (Германия).

Активность ММП-2 и ММП-7 в образцах сыворотки крови определяли с использованием флуоресцентного субстрата MCA-Pro-Ley-Gly-Leu-DPA-Ala-Arg-NH₂ (ICN Calbiochem Biomedicals Inc., USA), где MCA – метилкумариламид, и представляемого производителем специфического субстрата по отношению к ММП-2 и ММП-7. Метод определения активности этих ферментов подробно изложен нами ранее [6]. Измерение проводили на спектрофлуориметре RF-5301PC («Shimadzu», Япония) при экстинкции 325 nm, эмиссии 393 nm, активность выражали в мкмоль MCA/л в час.

Статистический анализ проводили с помощью программы «Статистический пакет для социальных наук», версия 21.0 (SPSS). Результаты исследования проверяли на нормальность распределения с использованием

критерия Колмагорова–Смирнова. При нормальном распределении значений применяли параметрический *t*-критерий Стьюдента. Для значений, закон распределения которых отличался от нормального, был применён непараметрический критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили по Спирмену, в том числе частичный (с поправкой на возраст и пол). Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Поражение клапанов сердца у пациентов варьировало от минимальных нарушений (небольшая регургитация, утолщение створок клапанов), выявляемых при эхокардиографии (ЭхоКГ), до тяжёлых пороков (стеноз или недостаточность клапанов сердца). В связи с этим требовалось проведение наиболее детального анализа тромботических наслоений. Диагноз НИЭ выставляли после исключения инфекционной природы, согласно критериям Duke [10]. У двух пациентов также выявили развитие сердечных тромбов, имитирующих миксому сердца. Наличие добавочной сухожильной хорды является предрасполагающим фактором для развития вегетаций на клапанном аппарате сердца, как инфекционной, так и неинфекционной природы. При проведении ЭхоКГ у 122 (69,7%) пациентов обнаружена сухожильная косая хорда – одно из проявлений недифференцированной дисплазии соединительной ткани. Установлено, что у 56 пациентов с НИЭ и у 66 – с ИЭ визуализирована сухожильная косая хорда, но несмотря на высокую частоту встречаемости, статистически значимой достоверности развития вегетаций у больных нами не получено. В группе пациентов с НИЭ отмечали поражение митрального клапана в 88,8% случаев, аортального клапана – в 51,3%. Формирование вегетаций на трикуспидальном клапане являлось наиболее частым при инфекционном эндокардите: в 77% случаев на интактных клапанах и 28% на изменённых. Нами обнаружена достоверно значимая частота поражения сердечных клапанов в обеих группах ($p = 0,03$).

При исследовании лабораторных параметров установлено снижение содержания гемоглобина в крови у пациентов в обеих группах (табл. 1). У пациентов с ИЭ (2-я группа) анемический синдром более выражен, причём содержание гемоглобина снижалось на 52%, а уровень гематокрита – на 80% по сравнению с таковыми у группы с НИЭ (1-я группа; $p = 0,03$). Подобный тяжёлый анемический синдром у больных на фоне эндокардита инфекционной природы был отмечен ранее [7]. По количеству эритроцитов между группами выявлена достоверная разница: $4,32 \pm 0,73 \times 10^{12}/л$ у пациентов с НИЭ и $3,94 \pm 0,85 \times 10^{12}/л$ у пациентов с ИЭ; $p = 0,03$.

В обеих группах наблюдали значительное повышение уровня высокочувствительного неспецифического маркера воспаления СРБ. Его содержание в 1-й группе (НИЭ) было в 12 раз, а во 2-й группе (ИЭ) – в 32 раза выше по сравнению с таковым у условно здоровых участ-

Таблица 1

Реактанты острой фазы воспаления у больных с эндокардитами неинфекционной (I) и инфекционной природы (II)

Реактанты острой фазы	Гемоглобин, г/л	Лейкоциты, $\times 10^9/л$	Гематокрит, %	СРБ, мг/л	Лимфоциты, в поле зрения	СОЭ, мм/ч	Фибриноген, г/л
НИЭ (1-я гр.)	$123,6 \pm 24,3$	$9,08 \pm 3,80$	$37,4 \pm 7,9$	$42,7 \pm 27,7$	$27,5 \pm 17,5$	$21,9 \pm 18,5$	$4,24 \pm 1,30$
ИЭ (2-я гр.)	$89,8 \pm 21,5$	$8,37 \pm 4,20$	$33,1 \pm 8,7$	$114,9 \pm 64,2$	$20,6 \pm 11,1$	$36,5 \pm 27,4$	$3,95 \pm 1,60$
Условно здоровые (3-я гр.)	$120,1 \pm 5,2$	$5,5 \pm 0,7$	$35,0 \pm 1,3$	$3,60 \pm 0,08$	$26,0 \pm 3,0$	$10,0 \pm 3,0$	$2,6 \pm 0,3$
p_{1-2}	0,02	–	0,004	0,01	0,002	0,009	–

Коэффициенты корреляции между концентрацией острофазных показателей у пациентов с эндокардитами

Коэффициент корреляции	СРБ, мг/л	Лимфоциты, в поле зрения	Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	Гематокрит, %	Фибриноген, г/л
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$r = 0,5$ $p < 0,001$	$r = -0,3$ $p < 0,002$	–	–	–
Гемоглобин, г/л	$r = -0,6$ $p < 0,001^*$	$r = 0,6$ $p < 0,001^*$	$r = -0,4$ $p < 0,001$	$r = 0,88$ $p < 0,001^*$	–
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч	$r = 0,5$ $p < 0,001$	$r = -0,3$ $p < 0,01$	–	$r = -0,5$ $p < 0,03^*$	–
Лимфоциты, в поле зрения	$r = -0,7$ $p < 0,001^*$	–	$r = -0,3$ $p < 0,05^*$	$r = 0,6$ $p < 0,002^*$	–
ММП-2, -7, мкмоль МСА/л в час	$r = 0,5$ $p < 0,012^*$	$r = -0,4$ $p < 0,05^*$	$r = 0,3$ $p < 0,05$	–	$r = -0,5$ $p < 0,04$
Гематокрит, %	$r = -0,5$ $p < 0,05^*$	$r = 0,6$ $p < 0,002^*$	$r = -0,5$ $p < 0,03^*$	–	–

Примечание. * - оценка корреляционных связей показателей с определением частичной корреляции по полу и возрасту.

ников. Полученный результат закономерен, так СРБ является острофазным показателем, который наиболее точно отражает активность инфекционного процесса. В группе с инфекционным эндокардитом содержание СРБ было в 2,7 раза выше, а количество лимфоцитов в 1,3 раза ниже по сравнению с группой с НИЭ. Развивающаяся лимфопения у пациентов с ИЭ, вероятно, связана с формированием иммунодефицита на фоне воспаления.

Кроме того, в обеих группах наблюдали значительное повышение количества лейкоцитов - в 1,6 раза (НИЭ) и в 1,5 раза (ИЭ) по сравнению с условно здоровыми лицами. Лейкоцитоз более $9,1 \times 10^9/\text{л}$ был выявлен в 27% случаев) или тромбоцитоз (тромбоцитов более $320 \times 10^{12}/\text{л}$) в 20% случаев.

Таким образом, результаты исследования общеклинических анализов крови больных показали наличие в обеих группах анемии, особенно в группе с ИЭ, увеличение содержания СРБ, количества лейкоцитов, увеличение СОЭ и фибриногена по сравнению с показателями условно здоровых лиц, что отражает активность воспалительных процессов в эндокарде в обеих группах.

Суммарная активность ММП-2 и ММП-7 исследована у 43 пациентов с вегетациями (9 мужчин и 11 женщин в группе с НИЭ и 11 мужчин и 12 женщин в группе с ИЭ). ММП являются секреторными ферментами, в структуре всех представителей имеется сигнальный пептид, необходимый для успешной секреции ММП из клетки [8]. Это обстоятельство позволяет судить об активности фермента при исследовании сыворотки крови. При анализе полученных результатов показано значительное повышение активности ММП-2 и ММП-7 в сыворотке крови больных с синдромом вегетаций по сравнению с активностью ферментов в крови здоровых лиц – $4,16 \pm 2,28$ мкмоль МСА/л в час. В 1-й группе (НИЭ) активность ферментов составила $84,1 \pm 12,37$ мкмоль МСА/л в час; при этом минимальное значение составило 24,2, а максимальное - 253 мкмоль МСА/л в час. Во 2-й группе (ИЭ) активность ММП равнялась $227,3 \pm 44,70$ мкмоль МСА/л в час, минимальное значение составило 82,2, а максимальное 1106 мкмоль МСА/л в час. Нами в данном исследовании не было выявлено достоверной разницы между показателями при эндокардитах различной природы. Кроме того, больных разделили на группы по полу и возрасту, но не было обнаружено различий.

Высокие значения СРБ и повышение активности ММП-2 и ММП-7 были отмечены у пациентов с атеросклеротическими поражениями сосудов, поступивших

в клинику для коронарного шунтирования [9]. В нашей работе также были выявлены повышение СРБ и активности ММП-2, -7 у пациентов с вегетациями инфекционной и неинфекционной природы. Возможно, нами не было выявлено разницы между показателями больных с эндокардитами разной этиологии потому, что при обеих нозологиях есть системное воспаление (инфекционной или аутоиммунной природы). В группах больных с НИЭ и с ИЭ наблюдали лейкоцитоз, гиперфибриногемию, повышение СОЭ. Одним из высокочувствительных неспецифических маркеров воспаления у человека является СРБ, синтез которого увеличивается под воздействием IL-1, IL-6, ФНО- α [9]. В обеих группах отмечалось значительное повышение уровня СРБ. Известно, что клеточными источниками повышенного уровня ММП являются моноциты, фибробласты, нейтрофилы, макрофаги. Экспрессия ММП сходна с экспрессией белков острой фазы и регулируется противовоспалительными цитокинами, такими как ФНО- α , ФНО- γ и IL-1 β [8].

Проведена оценка корреляционных связей между острофазными показателями (табл. 2). Маркер СРБ имел наибольшее количество корреляционных связей: прямую средней силы с лейкоцитами, СОЭ, ММП-2, ММП-7; обратную среднюю корреляцию с гемоглобином, лимфоцитами, гематокритом. Нами выявлена обратная корреляционная связь средней силы между фибриногеном и активностью ММП-2 и ММП-7. Обратную связь между этими показателями можно объяснить тем, что активность ММП повышается в раннем периоде воспалительного процесса, как и уровень СРБ, а концентрация фибриногена несколько отсроченно. Показатели гемоглобина имели прямую сильную корреляционную связь с гематокритом (см. табл. 2). Также была обнаружена прямая корреляционная связь средней силы с лимфоцитами и обратная связь средней силы с реактантами воспаления (СОЭ и СРБ) по отношению к гемоглобину (см. табл. 2). Таким образом, нами выявлена закономерность: чем сильнее воспалительный процесс, тем тяжелее анемический синдром и выше активность ММП-2, -7.

В данной работе показаны преимущества в определении уровня ММП-2 и ММП-7 как маркера воспаления у пациентов с эндокардитами любой этиологии, достоверной разницы в показателях обеих групп мы не выявили. Как нозологический критерий определение суммарной активности ММП-2 и ММП-7 у пациентов с эндокардитами имеет преимущества по сравнению с

группой здоровых лиц. Однако в установлении этиологического фактора по-прежнему имеет значение критерий Duke [10].

Заключение. Несмотря на успешное внедрение в клиническую практику определения широкого спектра белков острой фазы воспаления, соответствующих тем или иным звеньям патогенеза, важной и нерешённой проблемой остается поиск лабораторных маркеров, сопровождающих воспалительно-деструктивные изменения в тканях. Повышение активности матричных металлопротеиназ ММП-2, -7 и корреляция с острофазными показателями, в том числе с фибриногеном, СРБ и СОЭ свидетельствуют об активации системного воспалительного ответа при повреждении эндокарда. Данное повышение ферментативной активности, вероятно, свидетельствует о важной роли ММП-2, -7 в развитии и прогрессировании эндокардита. Поэтому оценка суммарной активности ММП-2, -7 может являться биохимическим маркером для диагностики заболевания при выявлении поражения клапанного аппарата сердца. Предполагаем, что увеличение активности ММП-2, -7 сопряжено с изменением количественного и качественного состава белков экстрацеллюлярного матрикса и может приводить к формированию вегетаций. Эндокардит инфекционной природы отличается неблагоприятным течением, быстро формируется клапанный порок. В настоящее время около 50% пациентов переносят хирургическое вмешательство во время госпитализации [10]. Максимальные значения ММП-2, -7 зарегистрированы у пациентов с эндокардитами инфекционной природы (до 1106 мкмоль МСА/л в час), но определение суммарной активности ММП «золотым стандартом» диагностики различных эндокардитов не является. Острое воспаление может активировать эндогенные ингибирующие факторы, которые могут подавить воспалительный процесс, но могут и стимулировать внеклеточную экспрессию белкового матрикса, что приводит к формированию фиброзной ткани и необратимой дисфункции эндокарда. Изучение активности ММП и их ингибиторов открывает перспективу разработки новых методов диагностики и лечения эндокардитов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сейидов В.Г., Андрюков Б.Г. Современная этиотропная диагностика и рациональная антибактериальная терапия инфекционного эндокардита. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2011; 7(6): 765-9.
2. O'Grady N.P., Barie P.S., Bartlett J.G., Bleck T., Carroll K., Kalil A.C. et al. Guidelines for evaluation of new fever in critically ill adult patients: 2008 update from the American College of critical care medicine and the infectious diseases society of America. *Crit. Care Med.* 2008; 36:1330-49.
3. Fridman R. Preface - Matrix metalloproteinases. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2017; 1864(11):1925-6.
4. De Leon-Pennell K.Y., Meschiari C.A., Jung M., Lindsey M.L. Matrix Metalloproteinases in myocardial infarction and heart failure. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017; 147: 75-100.
5. Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Полонская Я.В., Волков А.М., Каштанова Е.В. Активность воспалительного процесса в разных типах нестабильных атеросклеротических бляшек. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 153(2): 150-4.
6. Потеряева О.Н. Русских Г.С., Чернышева А.С., Мокрушников П.В. Метод определения активности матричных металлопротеиназ в сыворотке крови. *Медицина и образование в Сибири*. 2010; (6). Available at: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?Id=461 (доступна с 10 июля 2010 г.).
7. Singh A., Shetty P.N., Singh B.M., Devasia T. Multiple drugs causing severe anemia in infective endocarditis. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug. Targets*. 2016; 16(1): 3-5.
8. Потеряева О.Н. Матричные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний (обзор литературы). *Медицина и образование в Сибири*. 2010; (5). Available at: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=449 (доступна с 10 июня 2010 г.).
9. Черканова М.С., Короленко Т.А., Бравве И.Ю., Герасимова Т.П. Активность металлопротеиназ и концентрация С-реактивного белка в крови с ишемической болезнью сердца при приеме статинов и коронарном шунтировании. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; 6: 9-11.
10. Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J., Bongiorni M.G., Casalta J-P, Zotti F.D. ESC Guidelines for the management of infective endocarditis of the European society of cardiology (ESC) endorsed by: European association for cardio-thoracic surgery (EACTS), the European association of nuclear medicine (EANM). *Eur. Heart J.* 2015; 36(44): 3036-7.

REFERENCES

1. Seyidov V.G., Andryukov B.G. Modern etiotropic diagnostics and rational antibacterial therapy of infective endocarditis. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*. 2011; 7(6): 765-9. (in Russian)
2. O'Grady N.P., Barie P.S., Bartlett J.G., Bleck T., Carroll K., Kalil A.C. et al. Guidelines for evaluation of new fever in critically ill adult patients: 2008 update from the American College of critical care medicine and the infectious diseases society of America. *Crit. Care Med.* 2008; 36:1330-49.
3. Fridman R. Preface - Matrix metalloproteinases. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2017; 1864(11):1925-6.
4. De Leon-Pennell K.Y., Meschiari C.A., Jung M., Lindsey M.L. Matrix Metalloproteinases in myocardial infarction and heart failure. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017; 147: 75-100.
5. Ragino Yu.I., Chernyavskiy A.M., Polonskaya Ya.V., Volkov A.M., Kashtanova E.V. The activity of the inflammatory process in different types of unstable atherosclerotic plaques. *Byulleten' jeksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2012; 153(2): 150-4. (in Russian)
6. Poteryaeva O.N. Russkikh G.S., Chernysheva A.S., Mokrushnikov P.V. Method for determining the activity of matrix metalloproteinases in serum. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri*. 2010; (6). Available at: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?Id=461 (accessed 10 July 2010). (in Russian)
7. Singh A., Shetty P.N., Singh B.M., Devasia T. Multiple drugs causing severe anemia in infective endocarditis. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets*. 2016; 16(1): 3-5.
8. Poteryaeva O.N. Matrix metalloproteinases: structure, regulation, role in the development of pathological conditions (literature review). *Meditsina i obrazovanie v Sibiri*. 2010; (5). Available at: http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=449 (accessed 10 June 2010). (in Russian)
9. Cherkanova M.S., Korolenko T.A., Bravve I.Yu., Gerasimova T.P. Activity of metalloproteinases and concentration of C-reactive protein in the blood with ischemic heart disease with statin therapy and coronary bypass. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2009; 6: 9-11. (in Russian)
10. Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J., Bongiorni M.G., Casalta J-P, Zotti F.D. ESC Guidelines for the management of infective endocarditis of the European society of cardiology (ESC) endorsed by: European association for cardio-thoracic surgery (EACTS), the European association of nuclear medicine (EANM). *Eur. Heart J.* 2015; 36(44): 3036-7.

Поступила 24.01.18

Принята к печати 01.02.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.316-008.8-073.584

Бельская Л. В.^{1,2}, Сарф Е.А.²

ОКОЛОСУТОЧНАЯ ДИНАМИКА СОСТАВА СЛЮНЫ ЧЕЛОВЕКА ПО ДАННЫМ ИК-ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИИ

¹Омский государственный технический университет, 644050, Омск;

²ООО «ХимСервис», 143026, Москва

Показано, что метод ИК-спектроскопии можно применять для выявления околосуточных изменений состава биологических жидкостей, в частности слюны. По интенсивности полос поглощения в области 1075 см⁻¹ можно судить о минерализующем потенциале, а также защитных свойствах гликопротеидов слюны. Полоса поглощения фосфолипидов коррелирует с содержанием кальция. Полосы поглощения 2963 и 3287 см⁻¹ характеризуют динамику коэффициента Na/K, что в свою очередь даёт информацию об активности симпатико-адреналовой системы и тиреоидном статусе. Существование внутренних закономерностей на ИК-спектре позволяет предположить, что в норме наблюдается равновесие между отдельными функциональными группами, отклонение от которого может характеризовать различные патологические состояния в организме человека.

Ключевые слова: слюна; ИК-спектроскопия; околосуточная динамика.

Для цитирования: Бельская Л.В., Сарф Е.А. Околосуточная динамика состава слюны человека по данным ИК-Фурье-спектроскопии. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (5): 277-281. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-277-281>

Bel'skaya L.V.^{1,2}, Sarf E.A.²

THE CIRCADIAN DYNAMICS OF COMPOSITION OF HUMAN SALIVA ACCORDING DATA OF INFRARED-FOURIER-SPECTROSCOPY

¹The Omsk State Technical University, 644050, Omsk, Russia

²The Society with Limited Liability "HimServis", 143026, Moscow, Russia

The article demonstrates that infrared spectroscopy technique can be applied for detecting circadian changes of content of biological fluids, including saliva. The intensity of absorption bands in area of 1075 cm⁻¹ can be used for evaluating both mineralization potential and defense characteristics of saliva glycoproteins. The absorption band of phospholipids correlates with content of calcium. The absorption bands 2963 and 3287 cm⁻¹ characterize dynamics of coefficient Na/K that in turn provides information about activity of simpatico-adrenal system and thyroidal status. The existence of inner patterns in infrared spectrum permits to suppose that in normal state there is a balance between particular functional groups and any deviation can characterize various pathological states in human organism.

Key words: saliva; infrared spectroscopy; circadian dynamics.

For citation: Bel'skaya L.V., Sarf E.A. The circadian dynamics of composition of human saliva according data of infrared-Fourier-spectroscopy. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(5): 277-281. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-277-281>

For correspondence: Bel'skaya L.V., candidate of chemical sciences, associate professor of the chair of Chemical Technology and Biotechnology of the Omsk State Technical University, e-mail: ludab2005@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 21.12.2017
Accepted 16.01.2018

Метод ИК-спектроскопии практически не применяется в клинической лабораторной диагностике в связи с необычайной сложностью состава и строения биологических жидкостей [1, 2]. В последнее время интерес исследователей привлекает слюна как перспективный объект для получения ценной диагностической информации [3–5]. Однако одним из факторов, ограничивающих широкое применение слюны, является высокая вариабельность её состава в норме [6, 7], что требует особого внимания к процедуре сбора образцов и установлению референсных пределов содержания отдельных компо-

нентов. Тем не менее высокую скорость изменения состава слюны можно использовать для мониторинга различных биоритмов (сезонных, околосуточных, циркадных и т.д.), что может представлять самостоятельное значение при изучении физиологических особенностей организма человека [8, 9]. До настоящего времени слюну применяли для исследования циркадианных биоритмов, связанных с мелатонином и кортизолом, как в норме, так и на фоне различных патологических состояний, а также для мониторинга уровня гормонов и ферментов [10, 11].

Слюна в ИК-спектроскопии в настоящее время находит ограниченное применение, в частности для диагностики заболеваний полости рта [12, 13]. В нескольких исследованиях получены многообещающие результаты, связанные с количественным анализом биохимических

Для корреспонденции: Бельская Людмила Владимировна, канд. хим. наук, доц. каф. химической технологии и биотехнологии; e-mail: ludab2005@mail.ru

компонентов, что позволяет получать информацию о биохимическом составе слюны в реальном времени без использования реагентов [14, 15]. Количественная оценка с использованием полос поглощения в инфракрасной области (4000–700 см⁻¹) выявила специфические полосы поглощения для белков, глюкозы, мочевины, секреторного иммуноглобулина А (sIgA), кортизола и фосфатов [16].

Исследования хронофизиологических особенностей состава слюны человека с применением метода ИК-спектроскопии до настоящего времени не проводились. При этом помимо возможности получения важной диагностической информации комбинирование слюны в качестве биосубстрата и метода ИК-спектроскопии имеет преимущества в таких областях медицины, как психиатрия, геронтология и педиатрия, где высока вероятность возникновения трудностей с получением биоматериала для анализа [17–22].

Цель исследования – выявление особенностей околосуточной динамики состава слюны в норме методом инфракрасной спектроскопии.

Материал и методы. В исследовании принимали участие 40 здоровых добровольцев (20 мужчин, 20 женщин, возраст 23,1 ± 0,9 года). Пробы слюны собирали в течение суток каждые 3 ч (в 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 ч) в течение 10 мин, после чего центрифугировали при 7000 об/мин. Во всех образцах определяли скорость саливации, pH, концентрацию ионов кальция, калия, натрия и неорганического фосфора с использованием системы капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ-105М (Льюэкс, Санкт-Петербург), рассчитывали коэффициенты Ca/P и Na/K.

Дополнительно образцы слюны объёмом 50 мкл высушивали в течение суток на подложке из селенида цинка в термостате при 37°C. ИК-спектры поглощения регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре «ФТ-801» (СИМЕКС) в диапазоне 500–4000 см⁻¹. Запись спектров проводили с числом сканов 32 с разрешением 4 см⁻¹.

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

Результаты и обсуждение. На первом этапе исследования были записаны ИК-спектры образцов слюны, полученных в течение суток с интервалом 3 ч. Спектры были сопоставлены по интенсивности спектральных полос, соответствующих основным группам макромолекул, а именно: липидам (300–2800 см⁻¹), белкам (1700–1600 см⁻¹ и 1560–1500 см⁻¹) и нуклеиновым кислотам (1250–1000 см⁻¹). Это позволило объединить образцы в две группы, собранные в дневное и ночное время, что подтверждено методами многомерного

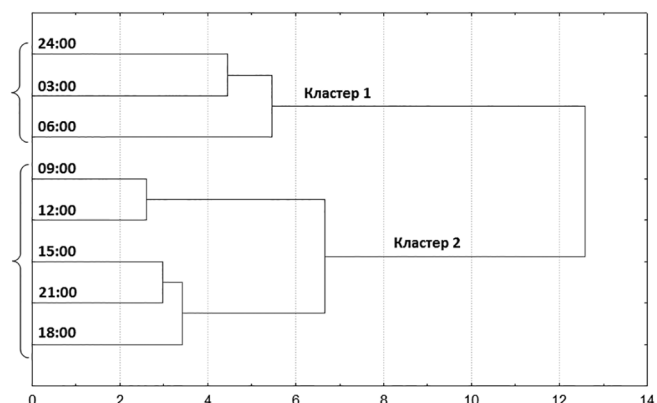


Рис.1. Результаты кластерного анализа по данным ИК-спектроскопии.

статистического анализа (рис.1). На древовидной диаграмме видно чёткое разделение всех образцов на два кластера: 24:00–06:00 (кластер 1) и 09:00–21:00 (кластер 2) (см. рис. 1, рис. 2).

В соответствии с близкими характеристиками ИК-спектров были рассчитаны медианы и интерквартильный размах значений биохимических параметров, а также интенсивности полос поглощения, соответствующих основным функциональным группам компонентов слюны (см. рис. 2, табл. 1).

Установлено, что в дневное время повышается интенсивность полос, соответствующих остаткам сахаров в гликопротеинах (1075 см⁻¹) и аминокислотным остаткам (1547 см⁻¹), но уменьшается интенсивность поглощения липидов слизистой оболочки полости рта (2963 см⁻¹) и свободных аминогрупп (3287 см⁻¹). Расчёт коэффициентов корреляции по Спирмену подтвердил наличие корреляции между содержанием белка в слюне и интенсивностью полос поглощения при 1547 и 3287 см⁻¹ (табл.2). Можно предположить, что увеличение интенсивности полос поглощения, характерных для са-

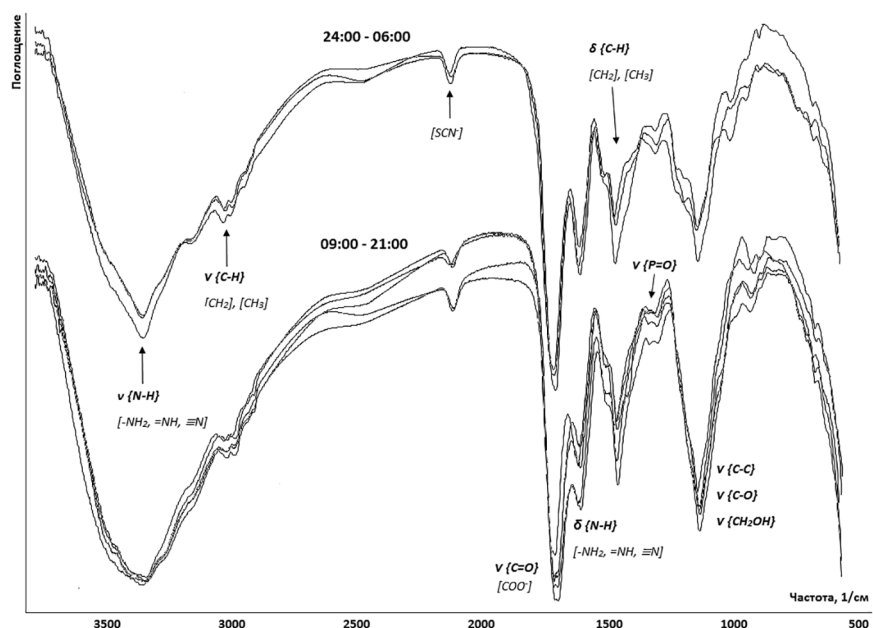


Рис.2. Динамика ИК-спектров слюны в течение суток (один образец).

Таблица 1

Биохимический состав и интенсивность полос поглощения слюны в дневное и ночное время

Показатель	24:00–06:00	09:00–21:00	p-value	
pH	6,52 [6,49; 6,62]	7,00 [7,00; 7,01]	<u>0,0245</u>	
Общий белок, мг/л	0,86 [0,78; 1,21]	0,35 [0,31; 0,41]	0,0526	
Скорость саливации, мл/мин	0,74 [0,45; 0,77]	1,10 [1,04; 1,25]	<u>0,0213</u>	
Ca/P	0,311 [0,254; 0,416]	0,267 [0,217; 0,351]	0,6547	
Na/K	1,059 [0,840; 1,309]	0,622 [0,531; 0,634]	<u>0,0271</u>	
Интенсивность, %	1075 см ⁻¹	25,5 [13,8; 42,3]	63,1 [61,5; 68,1]	<u>0,0154</u>
	1243 см ⁻¹	3,9 [2,6; 5,3]	3,0 [1,6; 3,5]	0,1797
	1403 см ⁻¹	17,5 [14,7; 40,2]	24,2 [14,5; 33,2]	0,6547
	1547 см ⁻¹	27,2 [23,9; 29,0]	47,6 [32,0; 50,9]	<u>0,0253</u>
	1648 см ⁻¹	60,6 [15,0; 65,1]	51,3 [32,6; 59,9]	0,4561
	2060 см ⁻¹	6,9 [6,1; 7,9]	6,2 [4,4; 6,3]	0,2967
	2963 см ⁻¹	2,6 [2,2; 2,6]	1,2 [0,6; 1,6]	<u>0,0339</u>
	3287 см ⁻¹	19,2 [16,9; 36,9]	14,7 [12,6; 15,3]	<u>0,0353</u>

Примечание. Здесь и в табл. 2: подчеркнуты статистически достоверные отличия между группами и статистически значимые коэффициенты корреляционной связи по Спирмену.

харов и аминокислот, связано с поступлением данных веществ из пищи, тогда как липиды в большей степени поступают в слюну из клеточных мембран слизистой оболочки полости рта под влиянием жизнедеятельности микрофлоры в ночное время.

Выявленные особенности ИК-спектров слюны подтверждаются изменениями, наблюдаемыми по данным биохимического анализа (см. табл. 1, 2). Так, увеличение интенсивности полосы поглощения 1075 см⁻¹ показывает сильную отрицательную корреляцию с содержанием общего белка. При этом отмечается положительная корреляционная связь с кислотностью среды и отрицательная с содержанием натрия и фосфора. Известно, что минерализующая функция слюны во многом обусловлена электролитными компонентами, так как основным веществом эмали является гидроксилпатит Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. Благодаря этому эмаль способна к обратимому изо-

морфному замещению своих ионов на ионы слюны без разрушения кристаллической структуры и резкого изменения свойств. Минерализующая функция слюны осуществляется вследствие её пересыщенности ионами Ca²⁺ и HPO₄²⁻. Основной механизм поддержания пересыщенности слюны этими ионами – в их мицеллярном состоянии [23, 24]. Ядро мицеллы состоит из Ca₃(PO₄)₂, потенциалопределяющие ионы – HPO₄²⁻, противоионы – Ca²⁺, они же входят в состав диффузного слоя [25]. В слюне мицеллы защищены от агрегации в основном гликопротеидом муцином, который в силу своей высокой поверхностной активности способен адсорбироваться на коллоидных частицах, проявляя защитное действие [26]. Значительное повышение концентрации доминирующих катионов слюны (натрий и калий) приводит к ослаблению защитных свойств биополимеров в связи с разрушением гидратных оболочек макромолекул гликопротеидов и их денатурацией [27]. Повышение кислотности среды, напротив, способствует увеличению стабильности мицелл фосфатов кальция, а значит, будет способствовать более высокому уровню углеводсодержащих белков в слюне. Таким образом, по интенсивности полосы поглощения 1075 см⁻¹ можно косвенно оценивать защитные свойства гликопротеидов слюны, что в свою очередь даёт информацию о минерализующем потенциале слюны.

Полоса поглощения, соответствующая фосфолипидам (1243 см⁻¹), коррелирует с концентрацией кальция, что, по-видимому, обусловлено комплексобразованием между данными компонентами слюны. Дополнительным подтверждением является также положительная корреляция уровня кальция и интенсивности полосы 2963 см⁻¹ (см. табл. 2).

Интересно отметить существование отрицательной корреляционной связи между скоростью саливации и содержанием белков и липидов в слюне (1547, 2963 и 3287 см⁻¹), тогда как увеличение скорости саливации коррелирует с ростом уровня сахаров (1075 см⁻¹).

Выявленные особенности динамики коэффициента Na/K обусловлены снижением уровня натрия и повышением концентрации калия, что может являться результатом выраженного напряжения симпатико-адреналовой системы [28] (см. табл. 1). Известно, что показатели уровня натрия и калия в слюне находятся в обратной зависимости

Таблица 2

Коэффициенты корреляции между составом слюны и интенсивностью полос поглощения в ИК-спектре

Показатель	Интенсивность полос поглощения						
	1075	1243	1403	1547	1648	2963	3287
pH	<u>0,7785</u>	-0,3593	-0,1317	<u>-0,7425</u>	-0,1677	<u>-0,7748</u>	-0,5868
Ca, ммоль/л	-0,1429	<u>0,6429</u>	-0,2619	0,3810	0,3571	<u>0,6786</u>	0,2857
P, ммоль/л	<u>-0,7381</u>	-0,1429	0,1190	0,4048	0,0952	0,1786	0,5476
K, ммоль/л	-0,2143	-0,1905	-0,3571	-0,0714	0,1429	-0,2500	0,1190
Na, ммоль/л	<u>-0,7143</u>	0,5000	-0,0714	0,6190	0,3333	0,6429	<u>0,8333</u>
Общий белок, г/л	<u>-0,9524</u>	0,1429	0,1429	<u>0,7143</u>	0,1667	0,4286	<u>0,7143</u>
Скорость саливации, мл/мин	<u>0,6905</u>	-0,5952	-0,0476	<u>-0,6667</u>	-0,4048	<u>-0,7500</u>	<u>-0,9048</u>
Ca/P	0,3571	0,4762	-0,2857	-0,0714	0,1667	0,2143	-0,1905
Na/K	-0,4762	0,5000	0,1905	0,5476	0,0952	<u>0,7857</u>	<u>0,6190</u>

Таблица 3

Корреляционные взаимосвязи между полосами поглощения в спектре слюны

Волновое число, см ⁻¹	Коэффициент корреляции по Спирмену
1075	1547 см ⁻¹ (R=-0,8095), 3287 см ⁻¹ (R=-0,8810)
1243	1648 см ⁻¹ (R=0,8333)
1403	1648 см ⁻¹ (R=-0,7381)
1547	1075 см ⁻¹ (R=-0,8095), 2963 см ⁻¹ (R=0,8929), 3287 см ⁻¹ (R=0,7143)
1648	1243 см ⁻¹ (R=0,8333), 1403 см ⁻¹ (R=-0,7381)
2963	1547 см ⁻¹ (R=0,8929)
3287	1075 см ⁻¹ (R=-0,8810), 1547 см ⁻¹ (R=0,7143)

от уровня кортикостероидов и катехоламинов в крови [29]. Резкое снижение экскреции натрия со слюной в утренние часы может свидетельствовать о переходе организма от пассивного поведения к активной деятельности, которая характеризуется повышением уровня обменных процессов, усилением гормональной активности и тонуса симпатического отдела вегетативной нервной системы.

Из данных литературы известно, что в норме существуют статистически достоверные корреляционные связи между концентрацией натрия в слюне и экскрецией норадреналина, а также концентрациями гормонов щитовидной железы (ТТГ, Т3 и Т4), что свидетельствует о сбалансированном функционировании нервной, тиреоидной систем и надпочечников [30]. Секретция ТТГ происходит в пульсирующем режиме: максимальная частота и амплитуда пульсации приходятся на ночное время с пиковым уровнем в 2–4 часа ночи, минимальный уровень соответствует послеполуденному времени [31]. Данный факт позволяет косвенно оценивать циркадианные ритмы уровня тиреоидных гормонов по динамике концентрации натрия в слюне. Расчёт коэффициентов корреляции подтверждает прямо пропорциональную зависимость содержания натрия в слюне и интенсивности полосы поглощения амида А (3287 см⁻¹), а также коэффициента Na/K и интенсивностей полос 2963 и 3287 см⁻¹. Установленный факт позволяет использовать данную область спектра для мониторинга околосуточной динамики функционирования нервной и тиреоидной систем.

Дополнительно стоит обратить внимание на внутренние закономерности между интенсивностью отдельных полос поглощения на ИК-спектре слюны (табл.3).

Так, полосы поглощения амидов и сахаров показывают отрицательную корреляцию, тогда как структурные фрагменты амидов (например, 1547 и 3287 см⁻¹) положительно коррелируют между собой. Валентные колебания связи C=O коррелируют с уровнем фосфолипидов (1243 см⁻¹) и метиленовых групп боковых цепей аминокислот, липидов и белков (1403 см⁻¹). В целом, потенциально информативным может быть расчёт соотношений интенсивностей (площадей) полос поглощения различных функциональных групп.

Заключение. Таким образом, метод ИК-спектроскопии можно применять для выявления околосуточных изменений состава биологических жидкостей, в частности слюны. По интенсивности полос поглощения в области 1075 см⁻¹ можно судить о минерализующем потенциале, а также защитных свойствах гликопротеидов слюны. Полоса поглощения фосфолипидов коррелирует с содержанием кальция в слюне, тогда как полосы поглощения 2963 и 3287 см⁻¹ характеризуют динамику коэффициента

Na/K, что в свою очередь даёт информацию об активности симпатико-адреналовой системы и тиреоидном статусе. Существование внутренних закономерностей на ИК-спектре позволяет предположить, что в норме наблюдается равновесие между отдельными функциональными группами, отклонение от которого может характеризовать различные патологические состояния в организме человека. В связи с этим продолжение исследований в выбранном направлении является перспективным.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордеев А.С. Инфракрасная спектроскопия биологических жидкостей и тканей. *Современные технологии в медицине.* 2010; 1: 84-8.
3. Зубарева Г.М., Микин В.М., Бордина Г.Е., Беляева И.А., Лопина Н.П., Зубарев С.М., Каргаполов А.В. Инфракрасная спектрометрия в изучении ротовой жидкости для диагностических целей. *Стоматология.* 2009; 5: 7-10.
29. Геворкян Э.С., Минасян С.М., Абрамян Э.Т. Уровень электролитов и оксида азота в слюне студентов при умственно-эмоциональном напряжении. *Гигиена и санитария.* 2014; 4: 81-5.
30. Колычева И. В., Рычагова О. А., Лизарев А. В. Влияние факторов трудовой деятельности на содержание натрия в слюне пожарных. *Гигиена и санитария.* 2015; 94 (4): 44-7.
31. Свиридонова М. А., Фадеев В. В. Значение вариабельности уровня ТТГ в клинической практике. *Клиническая и экспериментальная тиреология.* 2008; 4 (4): 16-24.

REFERENCES

1. Gordetsov A.S. Infrared spectroscopy of biological fluids and tissues. *Sovremennye tekhnologii v meditsine.* 2010; 1: 84-8. (in Russian)
2. Orphanou C.-M. The detection and discrimination of human body fluids using ATR FT-IR spectroscopy. *Forensic Science International.* 2015; 252: 10-6.
3. Zubareva G.M., Mikin V.M., Bordina G.Ye., Belyayeva I.A., Lopina N.P., Zubarev S.M., Kargapolov A.V. Infrared spectrometry in the study of oral fluid for diagnostic purposes. *Stomatologiya.* 2009; 5: 7-10. (in Russian)
4. Seredin P., Goloshchapov D., Kashkarov V., Ippolitov Y., Bamberg K. The investigations of changes in mineral-organic and carbon-phosphate ratios in the mixed saliva by synchrotron infrared spectroscopy. *Results in Physics.* 2016; 6: 315-21.
5. Caetano Júnior P.C., Ferreira-Strixino J., Raniero L. Analysis of 6. saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. *Res. Biomed. Eng.* 2015; 31: 116-24.
6. Neyraud E., Palicki O., Schwartz C., Nicklaus S., Feron G. Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Archives of oral biology.* 2012; 57: 556-66.
7. Quintana M., Palicki O., Lucchi G., Ducrooy P., Chambon C., Salles C., Morzel M. Inter-individual variability of protein patterns in saliva of healthy adults. *Journal of proteomics.* 2009; 72: 822-30.
8. Aubin S., Kupers R., Ptito M., Jennum P. Melatonin and cortisol profiles in the absence of light perception. *Behavioural Brain Research.* 2017; 317: 515-21.
9. Motta E., Czuczwar S. J., Ostrowska Z., Golba A., Soltky J., Norman R., Woźnik G. Circadian profile of salivary melatonin secretion and its concentration after epileptic seizure in patients with drug-resistant epilepsy – Preliminary report. *Pharmacological Reports.* 2014; 66 (3): 492-8.
10. Prodan A., Brand H. S., Ligtenberg A. J. M., Imangaliyev S., Tsvitvadze E., van der Weijden G. A., Crielaard W., Keijser B. J. F., Veerman E. C. I. Interindividual variation, correlations, and sex-related differences in the salivary biochemistry of young healthy adults. *European Journal of Oral Science.* 2015; 123: 149-57.
11. Wang Z., Shen M.-M., Liu X.-J., Si Y., Yu G.-Y. Characteristics of the saliva flow rates of minor salivary glands in healthy people. *Archives of oral biology.* 2015; 60: 385-92.
12. Giorgini E., Balercia P., Conti C., Ferraris P., Sabbatini S., Rubini C., Tosi G. Insights on diagnosis of oral cavity pathologies by infrared spectroscopy: A review. *Journal of Molecular Structure.* 2013; 1051 (5): 226–232.

13. Yip H.K., To W.M. An FTIR study of the effects of artificial saliva on the physical characteristics of the glass ionomer cements used for art. *Dental Materials*. 2005; 21: 695–703.
14. Khaustova S., Shkurnikov M., Tonevitsky E., Artyushenko V., Tonevitsky A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *Analyst (London)*. 2010;135(12):3183-92.
15. Perez-Guaita D., Ventura-Gayete J., Pérez-Rambla C., Sancho-Andreu M., Garrigues S., de la Guardia M. Protein determination in serum and whole blood by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012; 404(3):649-56.
16. Khaustova S.A., Shkurnikov M.U., Grebenyuk E.S., Artyushenko V.G., Tonevitsky A.G. Assessment of biochemical characteristics of the saliva using Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009; 148(5):841-4.
17. Ryan R., Clow A., Spathis A., Smyth N., Barclay S., Fallon M. Salivary diurnal cortisol profiles in patients suffering from chronic breathlessness receiving supportive and palliative care services: A cross-sectional study. *Psychoneuroendocrinology*. 2017; 79: 134–45.
18. Adam E.K., Hoyt L.T., Granger D.A. Diurnal alpha amylase patterns in adolescents: Associations with puberty and momentary mood states. *Biological Psychology*. 2011; 88: 170–3.
19. Al-Turk W., Al-Dujaili E. A.S. Effect of age, gender and exercise on salivary Dehydroepiandrosterone circadian rhythm profile in human volunteers. *Steroids*. 2016; 106: 19-25.
20. Cash E., Sephton S.E., Chagpar A.B., Spiegel D., Rebholz W.N., Zimmaro L.A., Tillie J.M., Dhabhar F.S. Circadian disruption and biomarkers of tumor progression in breast cancer patients awaiting surgery. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2015; 48: 102-14.
21. Jerjes W.K., Cleare A.J., Wessely S., Wood P.J., Taylor N.F. Diurnal patterns of salivary cortisol and cortisone output in chronic fatigue syndrome. *Journal of Affective Disorders*. 2005; 87: 299–304.
22. Tordjman S., Anderson G.M., Keramarrec S., Bonnot O., Geoffroy M.-M., Brailly-Tabard S., Chaouch A., Colliot I., Trabado S., Bronsard G., Coulon N., Botbol M., Charbuy H., Camus F., Touitou Y. Altered circadian patterns of salivary cortisol in low-functioning children and adolescents with autism. *Psychoneuroendocrinology*. 2014; 50: 227-45.
23. Rykke M., Young A., Devold T., Smistad G., Rolla G. Fractionation of salivary micelle-like structures by gel chromatography. *European Journal of Oral Science*. 1997; 105: 495-501.
24. Soares R.V., Lin T., Siqueira C.C., Bruno L.S., Li X. Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. *Archives of Oral Biology*. 2004; 49 (5): 337-43.
25. Young A., Rykke M., Rolla G. Quantitative and qualitative analyses of human salivary micelle-like globules. *Acta Odontologica Scand.* 1999; 57: 105-10.
26. Inoue H., Ono K., Masuda W., Inagaki T., Yokota M., Inenaga K. Rheological properties of human saliva and salivary mucins. *J. Oral Biosciences*. 2008;50(2): 134-41.
27. Bel'skaya L.V., Kosenok V.K., Sarf E.A. Chronophysiological features of the normal mineral composition of human saliva. *Archives of Oral Biology*. 2017; 82: 286-92.
28. Jirakulsomchok D., Schneyer C. Effects of α , β_1 , and β_2 adrenergic antagonists on the Na and K concentrations of sympathetic-nerve stimulated rat saliva. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1987; 20: 65-71.
29. Gevorkyan E.S., Minasyan S.M., Abraamyan E.T. The level of electrolytes and nitric oxide in the saliva of students with mental and emotional stress. *Gigiyena i sanitariya*. 2014; 4: 81-5. (in Russian)
30. Kolycheva I.V., Rychagova O.A., Lizarev A.V. The influence of labor factors on the sodium content in the saliva of firefighters. *Gigiyena i sanitariya*. 2015; 94 (4): 44-7. (in Russian)
31. Sviridonova M.A., Fadeyev V.V. The significance of the TSH level in clinical practice. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya*. 2008; 4 (4): 16-24. (in Russian)

Поступила 21.12.17
Принята к печати 16.01.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.127-089.843-07:616.153.466

Жлоба А.А.^{1,2}, Субботина Т.Ф.^{1,2}, Молчан Н.С.¹

ЗНАЧЕНИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ГОМОАРГИНИНА У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ПРИ ОПЕРАЦИЯХ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ МИОКАРДА

¹ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург;

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава РФ, 197341, Санкт-Петербург

Гомоаргинин (гАрг) предложен в качестве прогностического метаболического критерия угрозы инсульта и инфаркта миокарда и оценен в этом качестве в ряде популяционных исследований. В настоящем исследовании изучено содержание этого кардиометаболического маркера и основных аминокислот в плазме крови 59 пациентов (46 мужчин и 13 женщин, возраст $61,4 \pm 6,2$ года) с ишемической болезнью сердца, направленных на плановую операцию аортокоронарного шунтирования, а также 30 здоровых лиц в возрасте $50,4 \pm 9,2$ года. Концентрацию гАрг и аминокислот в плазме крови определяли с помощью ВЭЖХ с определением ортофталевых производных с флуориметрическим детектированием по разработанному нами методу. У обследованных пациентов наблюдается существенное снижение уровня гАрг в плазме венозной крови. В отличие от здоровых, у пациентов наблюдается положительная зависимость уровня гАрг от содержания уровня лизина и аргинина в плазме крови. Эти аминокислоты являются субстратами реакции, катализируемой аргининглицинамидинотрансферазой (АГАТ), в которой образуется гАрг. Таким образом, у пациентов уровень гАрг в плазме крови зависит не только от активности АГАТ в тканях, но и от содержания лизина и аргинина. Содержание этих аминокислот в крови может резко повышаться при активации свертывания и фибринолиза. В результате этого, по-видимому, наблюдается усиление биосинтеза гАрг у части пациентов, нивелируя пониженный его уровень. У пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями при определении гАрг следует также учитывать уровень аргинина и лизина в крови.

Ключевые слова: гомоаргинин; лизин; аргинин; аминокислоты; ишемическая болезнь сердца; аортокоронарное шунтирование.

Для корреспонденции: Жлоба Александр Анатольевич, д-р. мед. наук, проф., рук. отдела биохимии научно-образовательного института биомедицины ПСПбГМУ им. И.П. Павлова; рук. группы протеомики СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова; e-mail: zhloba@mail.spbnit.ru

Для цитирования: Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С. Значение определения уровня гомоаргинина у пациентов с ишемической болезнью сердца при операциях реваскуляризации миокарда. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (5): 281-286. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-281-286>

Zhloba A.A.^{1,2}, Subbotina T.F.^{1,2}, Molchan N.S.¹

THE VALUE OF DETECTION OF HOMOARGININE LEVEL IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE UNDER OPERATIONS OF MYOCARDIUM RE-VASCULARIZATION

¹The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Pavlov First Saint Petersburg State Medical University" of Minzdrav of Russia, 197022, St. Petersburg, Russia

²The Federal State Budget Institution "The V.A. Almazov National Medical Research Center" of Minzdrav of Russia, 197341, St. Petersburg, Russia

The homoarginine is proposed as a prognostic metabolic criterion of danger of stroke and myocardium infarction and evaluated in this capacity in a number of population studies.

The actual study analyzed content of this cardio-metabolic marker and main amino acids in blood plasma of 59 patients (46 males and 13 females, aged $61,4 \pm 6,2$ years) with ischemic heart disease sent to planned operation of aortocoronary bypass surgery and also 30 healthy individuals aged $50,4 \pm 9,2$ years. The concentration of homoarginine and amino acids was detected using high-performance liquid chromatography with identification of ortho-phthalic derivative with fluorometric detecting using genuine developed technique. The examined patients had a significant decreasing of level of homoarginine in venous blood plasma. In contrast to healthy individuals, the patients were detected a positive dependence of level of homoarginine from content of level of lysine and arginine in blood plasma. These amino acids are substrates of reaction generating homoarginine catalyzed by arginase (arginine aminohydrolase). Thus, in patients' level of homoarginine in blood plasma depends both on activity of arginase and on content of lysine and arginine. The content of these amino acids in blood can abruptly increase at activation of coagulation and fibrinolysis. Consequently, it appears that increasing of bio-synthesis of homoarginine occurs in certain patients leveling its decreased level. In patients with cardio-vascular diseases at detection of homoarginine a level of arginine and lysine in blood is to be considered.

Key words: homoarginine; lysine; arginine; amino acids; ischemic heart disease; aortocoronary bypass surgery.

For citation: Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S. The value of detection of homoarginin level in patients with ischemic heart disease under operations of myocardium re-vascularization. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(5): 281-286. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-281-286>

For correspondence: Zhloba A.A., doctor of medical sciences, professor, the head of the Department of Biochemistry of the Institute of Biomedicine of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Pavlov First Saint Petersburg State Medical University", e-mail: zhloba@mail.spbniit.ru

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

Acknowledgment. The study was supported by the Grant of the Russian Foundation of Fundamental Research № NK 15-04-02480

Received 17.01.2018
Accepted 19.01.2018

Введение. Гомоаргинин (гАрг) – некодируемая аминокислота, содержащаяся в крови человека в концентрациях обычно менее 5 мкМ, привлекла внимание исследователей в последнее десятилетие, когда в ряде когортных и популяционных исследований была выявлена ассоциация низкого уровня гАрг и высокого риска развития острых сердечно-сосудистых осложнений, в первую очередь ишемического инсульта и инфаркта миокарда, а также была установлена более высокая смертность среди пациентов в когорте с низким уровнем гАрг [1–3]. В последние годы укрепляется мнение о том, что гАрг можно рассматривать в качестве независимого прогностического маркера неблагоприятного исхода у пациентов с хронической сердечной недостаточностью [4]. Механизм, лежащий в основе данных взаимосвязей, в настоящее время не вполне ясен. Как правило, высокий уровень гАрг связывают с улучшением функции эндотелия, а именно с активацией пути синтеза оксида азота. С одной стороны гАрг сам является субстратом NO-синтаз, однако менее эффективным, чем аргинин, с другой – гАрг, являясь структурным аналогом лизина, обладает способностью последнего ингибировать аргиназу и может тем самым увеличивать концентрацию аргинина и его доступность для синтеза NO. Однако отсутствие выраженной ассоциации между концентрацией аргинина и уровнем смертности позволяет предположить, что эффекты гАрг не ограничены влиянием только на обмен аргинина [1].

Основным путём образования гАрг в организме человека является реакция, катализируемая аргининглицинамидинотрансферазой (АГАТ, КФ 2.1.4.1) [3]. Главное назначение этого фермента – обеспечение первой реакции в синтезе креатина. В ходе этой реакции, субстратами которой являются аргинин и глицин, образуются орнитин и гуанидинуксусная кислота. гАрг образуется в ней в небольших количествах в качестве побочного продукта в том случае, если место глицина занимает лизин.

Проблемой при определении гАрг в клинической лаборатории является его малая концентрация. Наиболее точный метод – масс-спектрометрический, однако он в настоящее время малодоступен. Наборы реактивов для иммуноферментного анализа, как правило, не гарантируют высокой точности. Более доступные методы анализа, в частности высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), довольно распространены, однако требуют дорогостоящей пробоподготовки, например, твердофазной экстракции [5]. Мы разработали менее дорогостоящий собственный метод определения гАрг путём ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [6], который и использовали в данной работе. Дополнительным преимуществом этого способа является возможность количественного определения гАрг наряду с другими кодируемыми и метаболическими аминокислотами, составляющими аминокислотный профиль, что может расширить диагностические возможности этой лабораторной технологии.

Цель настоящего исследования состояла в изучении уровня гАрг в плазме крови группы пациентов с ИБС, однородной по возрасту, нозологической, функциональным характеристикам, и сопоставлении полученных результатов с другими клинико-лабораторными данными, включая аминокислотный профиль.

Материал и методы. В исследование включено 59 пациентов с ИБС (46 мужчин и 13 женщин в возрасте 51–72 года), направленных на плановую операцию аортокоронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения клиники ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова с августа 2014 по октябрь 2016 г. Все пациенты имели многососудистое поражение коронарного русла с необходимостью реваскуляризации, хроническую сердечную недостаточность III функционального класса (фракция выброса левого желудочка не менее 50%) и артериальную гипертензию, требующую медикаментозной коррекции. Обязательным условием включения являлось также информированное согласие пациента на участие в исследовании. Исследование было одобрено этическим комитетом ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Критериями невключения являлись: отсутствие согласия пациента, сопутствующая клапанная патология, перенесённый острый инфаркт миокарда в предшествующие 6 нед, сердечная недостаточность с фракцией выброса левого желудочка менее 50%, сахарный диабет, хроническая болезнь почек > IIIБ стадии.

Венозную кровь для исследования получали непосредственно перед операцией аортокоронарного шунтирования из кубитальной вены через 15–30 мин после

индукции анестезии, но перед началом искусственного кровообращения. Методика анестезии у всех пациентов была однотипной. Различие заключалось лишь в том, что у 15 пациентов в качестве основного анестетика использовали десфлуран, а у 28 – севофлуран. В остальных 16 наблюдениях ингаляционный анестетик не использовали, а анестезию осуществляли внутривенным введением пропофола. Образцы крови, взятые в вакутейнеры, содержащие этидендиаминтетраацетат натрия в качестве антикоагулянта, немедленно помещали в холодильник (4°C), а затем отделяли плазму путём центрифугирования (1500 об/мин, 10 мин.) не позднее 30 мин после взятия. Аликвоты полученной плазмы хранили при -80°C вплоть до анализа.

Группу сравнения составили 30 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту с обследуемой группой пациентов – регулярные доноры старшей возрастной группы. Забор образцов крови производили из кубитальной вены после 10-часового голодания. Процессирование и хранение образцов осуществляли так же, как в группе пациентов.

Более подробная информация об обследованных представлена в табл. 1.

Уровень гАрг определяли в составе спектра 22 других аминокислот плазмы крови (за исключением аминокислот метионина) методом обращенно-фазного ВЭЖХ-анализа на хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) по разработанной нами технологии, подробно описанной в нашем патенте [6], с использованием ортофталевого альдегида для предколонной дериватизации и колонки Zorbax Eclipse AAA C18 (150 x 4,6) мм, 3,5 мкм. Концентрации аминокислот рассчитывали, используя норвалин в качестве внутреннего стандарта. Концентрацию общего гомоцистеина (оГци) определяли также с помощью ВЭЖХ описанным ранее методом [8].

Данные анализировали с применением программы Statistica 10.0 (Dell, Inc., USA). Степень соответствия распределения данных нормальному закону оценивали с помощью критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова – Смирнова. Сравнение групп с нормальным распределением проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. В случае распределения, отличного от нормального, применяли *U*-критерий Манна – Уитни. Анализ распределения частот проводили с помощью критерия согласия Пирсона и точного критерия Фишера. Статистическую связь между данными анализировали путём вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали различия данных и корреляции при *p* < 0,05.

Результаты. В табл. 2 приведены сравнительные данные пациентов с ИБС и здоровых людей, включающие концентрации гАрг и некоторых других аминокислот. Уровень гАрг в группе пациентов существенно ниже, чем у здоровых, причём размах выборки составлял 0,5–3,1 мкМ и был относительно больше, чем у доноров (1,6–4,2 мкМ). Наблюдаются также статистически значимые различия и по ряду других аминокислот: пациенты имеют более высокие уровни аргинина, лизина и метионина и более низкие уровни глицина и цитруллина в сравнении с донорами. По таким аминокислотам, как орнитин, оГци, фенилаланин, тирозин и таурин значимых различий не выявлено.

В группе пациентов обнаружены достаточно слабые, но статистически значимые положительные корреляции уровня гАрг с уровнем лизина ($R_s = 0,30$; *p* = 0,021) и

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика обследованных лиц

Показатель	Группа пациентов с ИБС, $M \pm \sigma$	Группа здоровых/референтный диапазон
Количество наблюдений	59	30
Демографические и общеклинические данные		
Мужчины/женщины, абс(%)	46 (78)/13 (22)	11(37)/19 (63)
Возраст, годы	61,4 ± 6,2	50,4 ± 9,2
ОИМ в анамнезе, абс(%)	33 (56)	0
Фракция выброса, % должного	62,0 ± 6,4	100
Индекс массы тела, кг/м ²	28,4 ± 3,6	до 25
Рутинные лабораторные данные		
Глюкоза, мМ	5,4 ± 0,7	4,6 – 6,1
Общий холестерин, мМ	4,5 ± 1,5	3,5 – 5,5
Креатинин, мкМ		
мужчины	91 ± 18	53 – 106
женщины	74 ± 12	44 – 97
Мочевина, мМ	5,6 ± 1,5	2,9 – 7,5
АлАТ, Ед/л	26 ± 15	До 40
АсАТ, Ед/л	24 ± 10	До 40
Фибриноген, г/л	3,4 ± 0,8	2,0 – 4,0
Фоновая терапия		
β-Блокаторы, абс (%)	59 (100)	–
Ингибиторы АПФ, абс (%)	46 (77)	–
Антитромботические препараты, абс (%)	50 (85)	–

Примечание. Собственные данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; референтный диапазон для рутинных лабораторных показателей приведён согласно [7]; ОИМ – острый инфаркт миокарда; АПФ – ангиотензинпревращающий фермент.

Таблица 2

Уровень гомоаргинина и других аминокислот (в мкМ) в изучаемых группах

Показатель	Группа пациентов с ИБС, n = 59	Группа здоровых, n = 30	p
Гомоаргинин	1,40 (1,0–2,0)	2,3 (1,8–3,1)	< 0,000001
Глицин	210 (171–242)	260 (227–323)	0,0001
Аргинин	77 (60–90)	55 (46–74)	0,0005
Лизин	160 (130–188)	102 (94–128)	< 0,000001
Орнитин	45 (33–55)	36 (30–47)	0,065
Цитруллин	25 (21–30)	42 (33–49)	< 0,000001
Метионин	24 (19–28)	17 (11–22)	0,0003
oГци	7,8 (6,1–10,5)	8,1 (6,5–10,3)	0,92
Фенилаланин	58 (49–67)	52 (45–60)	0,075
Тирозин	56 (48–64)	60 (52–67)	0,34
Таурин	26 (22–33)	25 (17–36)	0,43

Примечание. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала; достоверность различий оценивали с помощью непараметрического теста Манна–Уитни; oГци –общий гомоцистеин; гАрг – гомоаргинин.

аргинина ($R_s = 0,27$; $p = 0,030$). Также статистически значимой была отрицательная корреляция уровня гАрг и oГци ($R_s = -0,30$; $p = 0,021$). С остальными аминокислотами, приведёнными в табл. 2, величина R_s оказалась близкой к нулю. В группе доноров значимых корреляций гАрг выявлено не было.

Учитывая большую вариабельность показателя гАрг у пациентов с ИБС, а также потенциальное клиническое значение, которое придаёт этому показателю в качестве фактора риска острых сердечно-сосудистых осложнений, мы проанализировали показатели в подгруппах пациентов с высоким и низким уровнем гАрг, приняв за пограничные значения 25-й и 75-й процентиля, т.е. 1,0 и 2,0 мкМ гАрг соответственно. Результаты представлены в табл. 3.

Сравниваемые подгруппы достоверно различаются по уровню аргинина, лизина и oГци. Этот результат ожидаем, учитывая упомянутые выше положительные корреляционные связи этих показателей с уровнем гАрг. Также пациенты в подгруппе 1 (с низким уровнем гАрг) достоверно, хотя и не на много, старше. По остальным аминокислотам, а также по гендерному составу подгрупп различий не выявлено. Данные табл. 3 показывают также, что значения гАрг в подгруппе пациентов 2 и здоровых лиц ((2,3 (1,8–3,1) мкМ; см. табл. 2) практически совпадают. Несмотря на это частота встречаемости ОИМ в анамнезе в сравниваемых подгруппах 1 и 2 статистически не различается, что противоречит ожиданиям. Гистограммы распределения значений гАрг в группах пациентов с ИБС и доноров выявляют большую область перекрытия в диапазоне 1,5–2,5 мкМ, что ограничивает возможности однозначной диагностической интерпретации гАрг как клинического лабораторного показателя (см. рисунок, а).

Между тем введение расчётного показателя, учитывающего не только концентрацию самого гАрг, но и другой аминокислоты, метаболически с ним связанной, позволило бы добиться лучшего разделения групп. В табл. 3 представлены такие расчёты для аминокислот – участников реакции, катализируемой АГАТ, – аргинина, глицина, лизина и орнитина в подгруппах 1 и 2 пациентов. Сопоставления с аналогичными расчётами для группы здоровых показало, что лучшее разделение групп достигается при использовании соотношения гАрг/Лиз (см. рисунок, б). Вариабельность этого отношения (умноженного на 100 для удобства представления) составляет 2,10 (1,61–2,80) в группе доноров и 0,88 (0,65–1,24) в группе пациентов. Таким образом, граница нижнего квартиля доноров (1,61) оказывается выше границы верхнего квартиля группы пациентов с ИБС (1,24). Значение отношения (гАрг/Лиз)×100 менее 1,61, принятого нами за условную границу, имеют 52 (88%) пациента и только 25% здоровых лиц. Частота инфарктов миокарда в анамнезе среди этих пациентов составляет 30 случаев (91% от числа всех инфарктов в группе пациентов).

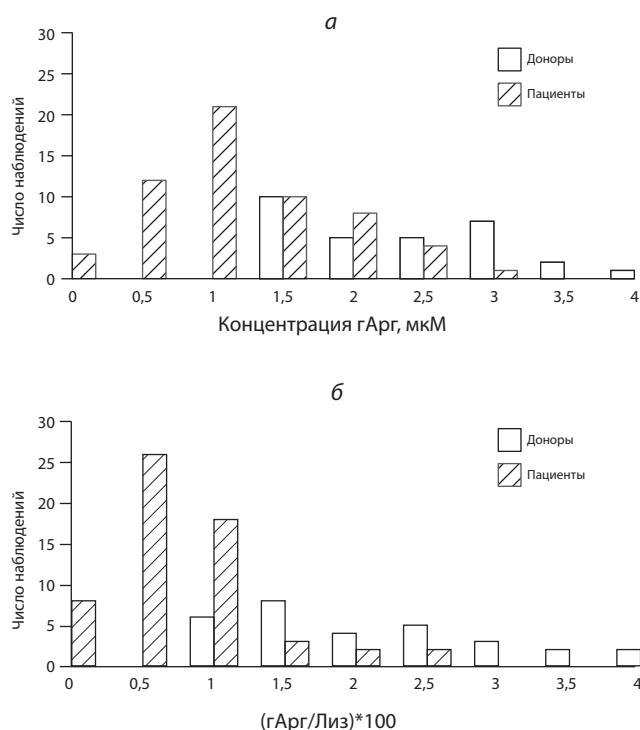
Обсуждение. Обнаруженное нами снижение уровня гАрг у пациентов с сердечно-сосудистой патологией соответствует уже достаточно многочисленным опубликованным данным [2, 4]. Несмотря на то что экспериментальные данные о роли гАрг в патогенезе атеросклероза не являются окончательными, чётко прослеживается отрицательная связь этого показателя с развитием хронической сердечной недостаточности, присутствующей (NYHA функциональный класс III) у всех пациентов,

Таблица 3

Сравнение показателей в подгруппах пациентов с высоким и низким уровнем гомоаргинина

Показатель	Подгруппа 1 пациенты с уровнем гАрг ≤ 1,0 мкМ	Подгруппа 2 пациенты с уровнем гАрг ≥ 2,0 мкМ	p
Число наблюдений	15	16	
гАрг, мкМ	0,8 (0,6 – 1,0)	2,2 (2,0 – 2,7)	< 0,000001
Глицин, мкМ	220 (168 – 242)	230 (178 – 267)	0,43
Аргинин, мкМ	71 (57 – 83)	93 (86 – 103)	0,003
Лизин, мкМ	147 (135 – 174)	189 (186 – 216)	0,013
Орнитин, мкМ	45 (31 – 55)	50 (43 – 82)	0,30
Фенилаланин, мкМ	53 (50 – 63)	62 (57 – 67)	0,24
Тирозин, мкМ	44 (43 – 47)	51 (38 – 67)	0,22
Таурин, мкМ	26 (24 – 39)	26 (25 – 33)	0,72
oГци, мкМ	9,1 (7,8 – 12,6)	6,8 (5,2 – 7,4)	0,022
Метионин, мкМ	22 (19 – 26)	26 (24 – 28)	0,094
(гАрг/Лиз)*100	0,50 (0,40 – 0,58)	1,18 (0,95 – 1,46)	< 0,000001
(гАрг/Арг)*100	1,08 (0,85 – 1,35)	2,47 (2,27 – 3,16)	< 0,000001
(гАрг/Орн)*100	1,75 (1,09 – 1,92)	5,12 (3,10 – 5,78)	0,0008
(гАрг/Гли)*100	0,38 (0,24 – 0,48)	1,12 (0,81 – 1,32)	0,000001
Возраст, лет	63 (61 – 67)	59 (54 – 62)	0,008
Мужчины/женщины, абс(%)	10 (67) / 5 (33)	11 (69) / 2 (31)	0,49
ОИМ в анамнезе, абс (%)	9 (60)	8 (50)	0,52

Примечание. Данные представлены в виде медианы (межквартильного интервала); достоверность различий оценивали с помощью непараметрического теста Манна–Уитни; анализ различий частот оценивали критерием хи-квадрат Фишера.



Гистограммы значений уровней гАрг (*а*) и отношений (гАрг/Лиз)×100 (*б*) в группах пациентов с ИБС ($n = 59$) и здоровых лиц ($n = 30$).

включённых в наше исследование. Следует отметить, что есть противоречивые данные: так, в исследовании [9] обнаружено, что при повышенном уровне гАрг в крови увеличивается остеохондрогенная трансформация клеток гладких мышц аорты человека и кальцификация аорты, тогда как в другой работе сообщается о полезной роли гАрг при экспериментальном повреждении сонных артерий у крыс со снижением гиперплазии неоинтимы [10]. В качестве прогностического маркера в оценке риска острых сердечно-сосудистых осложнений некоторые исследователи придают гАрг большее значение, чем мозговому натрийуретическому пропептиду [11]. Однако в рамках нашего исследования удалось установить некоторые новые закономерности.

Во-первых, уровень гАрг у пациентов данного исследования 1,4 (1 – 2) мкМ значимо не отличался от результатов, полученных нами ранее в другой группе пациентов с менее выраженной сердечной недостаточностью NYHA I–II функционального класса [12]. Таким образом, степень сердечной недостаточности – далеко не единственный фактор, влияющий на уровень гАрг, немаловажную роль играет природа патологического процесса: в настоящем исследовании это атеросклероз и ИБС, а в работе [12] – аневризма восходящего отдела либо стеноз аорты не атеросклеротической природы.

Во-вторых, нами в группе пациентов (но не в группе сравнения) установлена прямая связь между уровнями гАрг и субстратов реакции, в которой он образуется, – лизина и аргинина. Эта реакция катализируется ферментом АГАТ. Известно, что содержание гАрг в крови человека связано с активностью АГАТ в тканях, отражая интенсивность этой ключевой реакции образования креатина в организме в целом [13].

По-видимому, активность АГАТ в значительной мере определяется концентрациями её субстратов. В настоящей работе мы показали, что содержание субстратов АГАТ – лизина и аргинина (см. табл. 2) в крови у пациентов значительно выше, чем в группе сравнения. У 16 пациентов уровень гомоаргинина был выше 2,0 мкМ и уровень лизина у них был также высок, составляя 189 (186–267) мкМ, аргинина – 93 (86–103) мкМ (см. табл. 3). Таким образом, следует ожидать, что по крайней мере уровень одного из субстратов АГАТ, необходимых для образования гАрг, в первую очередь лизина, сродство которого к ферменту наиболее низкое, в значительной мере влияет на общее содержание гАрг в организме. При повышенных уровнях лизина и/или аргинина, по-видимому, наблюдается усиление биосинтеза гАрг у части пациентов, нивелируя пониженный уровень АГАТ в тканях. Это может объяснить случаи развития инфаркта миокарда или инсульта при достаточно высоком уровне гАрг, что отмечается во всех исследованиях [1–4]. Кроме того, «завышение» концентрации гАрг при высоком уровне лизина приводит к размыванию границы между нормой и патологией, когда невозможна однозначная диагностическая трактовка (см. рисунок, *а*). По нашему мнению, улучшить прогностическую значимость при анализе гАрг можно путём учёта высокого уровня лизина, например, введя предложенное нами отношение (гАрг/Лиз)×100 (см. рисунок, *б*).

Наконец, в аминокислотном профиле пациентов с ИБС мы обнаружили и другие отличия от показателей группы сравнения, помимо отмеченных выше аргинина и лизина (см. табл. 2). Следует подчеркнуть, что обнаруженные метаболические сдвиги происходили в условиях отсутствия дефицита незаменимых аминокислот как у пациентов, так и у лиц в группе сравнения, их концентрации были в границах референтных интервалов [7]. Можно предположить, что причиной повышенного уровня аргинина, лизина и метионина в данной группе пациентов может быть активация фибринолиза, хотя бы потому, что почти все пациенты получали антитромботические препараты (см. табл. 1). В опубликованной ранее работе [14] мы показали, что активация фибринолиза как в модельной системе, так и *in vivo* у пациентов с активированным внутрисосудистым свертыванием сопровождается высвобождением именно этих аминокислот, предположительно, вследствие активации ассоциированных с фибринолизом карбоксипептидаз [15]. Выраженное снижение уровня цитруллина в группе пациентов с ИБС может расцениваться как признак снижения образования цитруллина, например, в NO-синтазных реакциях [16].

Таким образом, лучшее выделение группы пациентов с повышенным уровнем гАрг, перенёсших инфаркт, достигалось с помощью референтной границы соотношения (гАрг/Лиз)×100. В группе доноров эта граница описывается по нашим данным значением 1,61. Из 33 пациентов, перенёсших инфаркт, у трёх соотношение было выше 1,61, т. е. в 9 % случаев роль гАрг в нарушениях метаболизма у пациентов, перенёсших инфаркт, была по этому критерию незначительна. При этом все три пациента отличались сочетанием хотя бы трёх других из четырёх неблагоприятных критериев, описанных в табл. 1, т. е. высоким индексом массы тела, высоким уровнем холестерина, гипергомоцистеинемией, гипергликемией.

Выводы.

1. Прогностическая значимость уровня гомоаргинина может быть улучшена путём учёта повышенных концентраций лизина и аргинина в плазме крови.

2. Способ определения гомоаргинина в составе спектра других аминокислот плазмы крови в рамках одной аналитической процедуры обладает преимуществами по сравнению с методами, оценивающими изолированный показатель гомоаргинина, поскольку даёт дополнительную информацию, существенную для пациентов с сердечно-сосудистой патологией.

Благодарность. Авторы выражают благодарность менеджменту ПСПбГМУ им. И.П. Павлова за организационную и информационную поддержку в ходе проведения настоящего исследования.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках выполнения государственного задания; методика определения гомоаргинина в составе спектра аминокислот разработана при поддержке гранта РФФИ № НК15-04-02480.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–5, 8–11, 13–16
см. REFERENCES)

6. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Шипаева К.А. Способ определения содержания гомоаргинина в плазме крови и других биологических жидкостях человека. Патент РФ № 2609873; 2017.
7. Тиц Н.У., ред. *Клиническая оценка лабораторных тестов: Справочник* (пер. с англ.). М.: Медицина; 1986.
12. Гаврилюк Н.Д., Субботина Т.Ф., Дружкова Т.А., Иртыга О.Б., Жлоба А.А., Алексеевская Е.С. и др. Клиническое значение исследования гомоаргинина у пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты и аортальным стенозом. *Артериальная гипертензия*. 2017; 23(5): 403–11.

REFERENCES

1. März W., Meinitzer A., Drechsler C., Pilz S., Krane V., Kleber M.E. et al. Homoarginine, cardiovascular risk, and mortality. *Circulation*. 2010; 122(10): 967–75.
2. Pilz S., Meinitzer A., Tomaschitz A., Drechsler C., Ritz E., Krane V. et al. Low homoarginine concentration is a novel risk factor for heart disease. *Heart*. 2011; 97 (15): 1222–7.
3. Choe C.U., Atzler D., Wild P.S., Carter A.M., Boger R.H., Ojeda F. et al. Homoarginine levels are regulated by L-arginine: glycine aminotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation*. 2013; 128(13): 1451–61.

4. Atzler D., Rosenberg M., Anderssohn M., Choe C.U., Lutz M., Zugck C. et al. Homoarginine—an independent marker of mortality in heart failure. *Int. J. Cardiol*. 2013; 168(5): 4907–9.
5. Teerlink T., Nijveldt R.J., de Jong S., van Leeuwen P.A. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem*. 2002; 303(2): 131–7.
6. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Shipaeva K.A. The Way for Determining the Content of Homoarginine in Blood Plasma and other Biological Fluids of Human. Patent RF № 2609873; 2017. (in Russian)
7. Tietz N.W., ed. *Clinical Guide to Laboratory Tests*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1983.
8. Zhloba A.A., Subbotina T.F. Homocysteinylation score of high-molecular weight plasma proteins. *Amino Acids*. 2014; 46(4): 893–9.
9. Alesutan I., Feger M., Tuffaha R., Castor T., Musculus K., Buehling S.S. et al. Augmentation of phosphate-induced osteo/chondrogenic transformation of vascular smooth muscle cells by homoarginine. *Cardiovasc. Res*. 2016; 110(3): 408–18.
10. Delleria F., Ganzetti G.S., Froio A., Manzini S., Busnelli M., Meinitzer A. et al. L-homoarginine administration reduces neointimal hyperplasia in balloon-injured rat carotids. *Thromb. Haemost.* 2016; 116(2): 400–2.
11. Raedle-Hurst T., Mueller M., Meinitzer A., Maerz W., Dschietzig T. Homoarginine—A prognostic indicator in adolescents and adults with complex congenital heart disease? Fukumoto Y, ed. *PLoS ONE*. 2017; 12(9): e0184333.
12. Gavrilyuk N.D., Subbotina T.F., Druzhkova T.A., Irtyuga O.B., Zhloba A.A., Alekseevskaya E.S. et al. Clinical significance of homoarginine level in patients with ascending aortic aneurysm and aortic stenosis. *Arterial'naya Gipertenziya*. 2017; 23(5): 403–11. (in Russian)
13. Atzler D., Schwedhelm E., Choe C.U. L-homoarginine and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2015; 18: 83–8.
14. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Lupan D.S., Bogova V.A., Kusheleva O.A. Arginine and lysine as products of basic carboxypeptidase activity associated with fibrinolysis. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2012; 6(3): 261–5.
15. Subbotina T.F., Zhloba A.A. Fibrinolysis as an additional source of basic amino acids in plasma. *Amino acids*. 2013; 45(3): 586.
16. Noris M., Benigni A., Boccardo P., Aiello S., Gaspari F., Todeschini M. et al. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension. *Kidney Int*. 1993; 44(2): 445–50.

Поступила 17.01.18
Принята к печати 19.01.18

©ГОЛОЩАПОВ-АКСЕНОВ Р.С., 2018

УДК 616.12-009.72-06:616.127-005.8-008.6-036.11-037-008.9-074

Голощанов-Аксенов Р.С.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ И ДИАГНОСТИКА ОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМА ПО ИНФОРМАТИВНЫМ ПАРАМЕТРАМ

ФПКМР Медицинского института Российского университета дружбы народов, 117198, Москва, Россия

Острый коронарный синдром является актуальной проблемой в медицине из-за высокой летальности и сложности диагностики. При этом неизвестной остаётся информативность лабораторных биомаркёров крови и отсутствуют математические модели для прогнозирования вероятности развития острого коронарного синдрома. Цель работы – оценка информативности лабораторных биомаркёров крови для осуществления прогнозирования острого коронарного синдрома без подъёма сегмента ST. Острый коронарный синдром изучен у 155 больных, у которых определена информативность лабораторных биомаркёров крови и методом пошагового регрессионного анализа проведено прогнозирование данной патологии. Для диагностики острого коронарного синдрома следует определять в периферической крови содержание тропонина T, креатинкиназы-MB, натрийуретического пептида, лактатдегидрогеназы-1 и лактатдегидрогеназы-2. Регрессионная модель, разработанная с включением в неё тропонина T, креатинкиназы-MB и натрийуретического пептида обеспечивает с высокой точностью прогнозирование острого коронарного синдрома.

Ключевые слова: острый коронарный синдром; лабораторные биомаркёры крови.

Для цитирования: Голощанов-Аксенов Р.С. Прогнозирование и диагностика острого коронарного синдрома по информативным параметрам. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (5): 287-289. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-287-289>

Goloschapov-Aksenov R.S.

THE PROGNOSTICATION AND DIAGNOSTIC OF ACUTE CORONARY SYNDROME ACCORDING INFORMATIVE PARAMETERS

The Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The Peoples' Friendship University of Russia", 117198, Moscow, Russia

The acute coronary syndrome is an actual problem in medicine because high lethality and complicity of diagnostic. At that, informativeness of laboratory biomarkers of blood continues to be unknown and mathematical models for prognosticating possibility of development of acute coronary syndrome are lacking. The purpose of study is to evaluate informativeness of laboratory biomarkers of blood for implementing prognostication of acute coronary syndrome without segment ST elevation. The acute coronary syndrome was analyzed in 155 patients with already established informativeness of laboratory biomarkers of blood and prognostication of the given pathology was applied using step-by-step regression analysis. To diagnose acute coronary syndrome content of troponin T, creatine kinase-MB, natriuretic peptide, lactate dehydrogenase-1 and lactate dehydrogenase-2 are to be detected in peripheral blood. The regression model developed with including in it troponin T, creatine kinase-MB, natriuretic peptide ensures with high accuracy prognostication of acute coronary syndrome.

Key words: acute coronary syndrome; laboratory biomarkers of blood.

For citation: Goloschapov-Aksenov R.S. The prognostication and diagnostic of acute coronary syndrome according informative parameters. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(5): 287-289. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-287-289>

For correspondence: Goloschapov-Aksenov R.S. candidate of medical sciences, researcher of the chair of cardio-vascular surgery of the Faculty of Advanced Training of Medical Personnel of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The Peoples' Friendship University of Russia", e-mail: mzmo-endovascular@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 28.01.2018

Accepted 03.02.2018

Введение. Острый коронарный синдром (ОКС) объединяет группу клинических признаков или симптомов, позволяющих подозревать острый инфаркт миокарда (ОИМ) или нестабильную стенокардию [1]. Несмотря на широкое внедрение ранних чрескожных коронарных вмешательств и применение новых мощных антитромбоцитарных препаратов для лечения больных с ОКС, частота рецидивов ишемических событий, связанных с атеротромбозом, остаётся достаточно высокой [2]. Еже-

суточно в Российской Федерации регистрируется от 9000 до 25 000 вызовов скорой медицинской помощи по поводу ОКС [3]. Среди больных с ОКС без подъёма сегмента ST (ОКСбпST), получавших ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел, частота ОИМ, ишемического инсульта и сердечно-сосудистой смерти в течение 12 мес составила 9,3% [4]. У 30–40% пациентов с диагнозом ОКС причиной ухудшения клинического состояния является дестабилизация ишемической болезни сердца и среди них до 80% не имеют подъёма сегмента ST [5].

В последние годы отмечается увеличение частоты развития ОКСбпST по сравнению с ОКС с подъёмом сегмента ST (ОКСпST), что подтверждают количество госпитализа-

Для корреспонденции: Голощанов-Аксенов Роман Сергеевич, канд. мед. наук каф. сердечно-сосудистой хирургии; e-mail: mzmo-endovascular@mail.ru

ций в стационары, выполненных операций по реваскуляризации миокарда и госпитальная летальность при данных вариантах ОКС. Летальность при ОКСбпST в России достигает 17,5–20,9%, при ОКСбпST – 2,3–2,9%, а в странах Европы при ОКСбпST – 7,5% и ОКСбпST – 2,9%[3].

Диагностика ОКСбпST остаётся сложной, так как ЭКГ в 12 отведениях может оказаться нормальной у двух третей больных и лишь у одной трети пациентов регистрируются характерные нарушения, включающие депрессию сегмента ST, транзиторную элевацию сегмента ST и изменения зубца T [6]. Поэтому лабораторные методы диагностики и определение биомаркёров играют важную роль в диагностике ОКСбпST [5]. Однако информативность лабораторных биомаркёров (ЛБ) крови при ОКСбпST неизвестна, как и неизученным остаётся прогнозирование данной патологии, что не позволяет проводить упреждающие лечебные мероприятия.

Цель выполненного исследования – оценка информативности ЛБ крови для осуществления прогнозирования ОКСбпST.

Материал и методы. Исследование выполнено на клинических базах кафедры сердечно-сосудистой хирургии ФПКМР Медицинского института Российской академии наук дружбы народов, Центральной городской клинической больницы г. Реутов Московской области в 2015–2016 гг.

Критерии включения: больные ОКСбпST с многососудистым поражением коронарного русла (риск по SYNTAXscore = 23–32); высокая и средняя степень риска по шкале GRACE; отсутствие в анамнезе реваскуляризации миокарда.

Критерии исключения: больные с очень высоким риском по шкале GRACE (кардиогенный шок, жизнеугрожающие аритмии, острая сердечная недостаточность и т.п.); поражение ствола левой коронарной артерии.

Обследовано 155 больных ОКСбпST (основная группа) и 48 практически здоровых лиц (контроль). Всем обследуемым делали ЭКГ в 12 отведениях, определяли ЛБ в периферической крови, содержание аспаргатамиотрансферазы (АСТ), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), тропонина Т, креатинкиназы-МВ, миоглобина, натрийуретического пептида, ЛДГ-1, ЛДГ-2 и креатинина. Определение креатинкиназы-МВ, тропонина Т выполнено иммунохроматографическим методом с использованием тестов FCONBiotech. Уровень ЛПВП определяли фотометрическим методом на автоматическом анализаторе ModularP-800/ISE (компания «РошДиагностика», Швейцария) с использованием реактивов и образцов этой же фирмы, миоглобина – иммунотурбидиметрическим методом для определения миоглобина в сыворотке на анализаторе Mindrayсерии BS, натрийуретического пептида – методом иммунохроматографии, креатинина – колориметрическим химическим методом Поппера, основанным на реакции Яффе. Содержание изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2 изучено с помощью электрофореза на ацетате целлюлозы.

Информативность ЛБ крови определялась по формуле:

$$J = 10 \lg \frac{P_1}{2 \times 0,5 \times (P_1 - P_2)}$$

где J – информативность признака, P_1 – распространённость изменений от нормы признака в контроле, P_2 – распространённость изменений от нормы данного же признака в основной группе (больные ОКСбпST).

Обработка данных проводилась с применением пакета Statistica 6.0. Для оценки достоверности использовались критерии Т-Уайта.

Результаты и обсуждение. Среди изученных ЛБ плазмы крови у больных с ОКСбпST наибольшие отклонения от аналогичных параметров контрольной группы имеют тропонин Т, креатинкиназа-МВ (см. таблицу). При этом изменения названных ЛБ крови характеризуются достоверным повышением у пациентов с ОКСбпST ($p < 0,001$). Так, в сравнении с контрольной группой у больных ОКСбпST установлено увеличение содержания в периферической крови тропонина Т в 437 раз, что указывает на важное диагностическое значение исследования данного ЛБ для верификации рассматриваемой патологии. Повышение содержания креатинкиназы-МВ возросло при развитии ОКСбпST в 5,4 раза по сравнению с группой контроля. Практически эквивалентные отклонения от показателей контрольной группы установлены при развитии ОКСбпST для миоглобина и натрийуретического пептида ($p < 0,001$). Как и предыдущие ЛБ крови, так и содержание миоглобина и натрийуретического пептида репрезентативно выше у пациентов с ОКСбпST. Изменение содержания миоглобина и натрийуретического пептида в крови больных ОКСбпST повысилось существенно – в 5,8 и 5,7 раза соответственно по отношению к контролю. Возрастные концентрации названных ЛБ крови, наряду с рассмотренными выше тропонином Т и креатинкиназой-МВ, позволяет отнести их к ЛБ, играющим ведущую роль в диагностике ОКСбпST. Репрезентативным у пациентов с ОКСбпST оказалось повышение содержания в крови АСТ ($p < 0,001$). Несколько ниже у больных ОКСбпST увеличение абсолютного значения активности ферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2 в крови, определение которых входило в задачи настоящего исследования. При этом соотношение активности данных изоферментов нами не рассматривалось. Менее выраженные изменения в группе исследованных ЛБ крови свойственны ЛПВП и креатинину, несмотря на статистически значимое превышение параметров по сравнению с контролем.

Диагностическая значимость ЛБ плазмы крови, оценённая по величине информативности, показывает что важнейшими ЛБ крови для верификации ОКСбпST являются тропонин Т, креатинкиназа-МВ и натрийуретический пептид, имеющие высокие значения меры информативности (см. таблицу). Информативность вышеперечисленных ЛБ крови при ОКСбпST различается незначительно, наивысшей обладает тропонин Т. Второе ранговое место по уровню информативности среди исследованных ЛБ

Лабораторные биомаркеры крови и их информативность у больных ОКСбпST

Лабораторный биомаркёр	Пациенты с ОКСбпST	Контроль	Информативность
АСТ, Ед, л	76,5 ± 2,4*	18,7 ± 1,8	392,6
ЛПВП, ммоль/л	1,0 ± 0,07*	1,8 ± 0,06	127,4
Тропонин Т, мкг/л	61,2 ± 4,1*	0,14 ± 0,03	587,5
Креатинкиназа-МВ, МЕ/л	362,8 ± 6,9*	67,1 ± 5,2	565,4
Миоглобин, мкг/л	274,5 ± 5,3*	47,2 ± 3,1	305,6
Натрийуретический пептид, пг/мл	368,5 ± 6,5*	64,7 ± 4,0	530,9
ЛДГ-1, МЕ/л	325,3 ± 4,2*	108,6 ± 3,4	475,2
ЛДГ-2, МЕ/л	236,4 ± 3,8*	90,8 ± 3,7	461,7
Креатинин, мкмоль/л	147,5 ± 3,2	78,1 ± 2,8	236,4

Пр и м е ч а н и е. * – различие достоверно по отношению к контролю.

крови занимает креатинкиназа-МВ, параметр информативности которой несколько ниже, чем тропонина Т. По отношению к показателю информативности последнего и креатинкиназы-МВ более существенно отличается аналогичный параметр натрийуретического пептида.

Высокая и практически одинаковая по величине информативность выявлена для изоферментов ЛДГ-1 и ЛДГ-2, которые, безусловно, также следует учитывать при лабораторной диагностике ОКСбпST как одни из приоритетных ЛБ плазмы крови наряду с указанными выше тропонином Т, креатинкиназой-МВ и натрийуретическим пептидом. Среди изученных ЛБ плазмы крови для выявления ОКСбпST важное значение имеет определение содержания АСТ, информативность которой характеризуется значительной величиной. Существенной для верификации диагноза ОКСбпST является информативность миоглобина, хотя её величина почти в 2 раза ниже идентичного показателя тропонина Т. Определение информативности других ЛБ крови у больных ОКСбпST позволило обнаружить, что значительную диагностическую ценность для данной патологии имеет содержание в плазме крови креатинина. Наиболее низкий показатель информативности при ОКСбпST среди исследованных ЛБ крови свойственен ЛПВП.

Методом пошагового регрессионного анализа для прогнозирования развития ОКСбпST создана математическая модель $y_1 = 8,56x_1 + 7,12x_2 + 6,24x_3 + 54,83$,

где y_1 – вероятность развития ОКСбпST, x_1 – содержание в плазме крови тропонина Т, x_2 – содержание в крови креатинкиназы-МВ, x_3 – содержание в крови натрийуретического пептида. Математическая модель адекватна по критерию Фишера ($p < 0,001$) и показывает, что при величине $y_1 = 936,73 - 54621,3$ и выше вероятность развития ОКСбпST высока ($p < 0,001$). При значении $y_1 = 935,73$ и менее прогнозируется отсутствие у пациента ОКСбпST ($p < 0,001$).

На неблагоприятный прогноз указывает, по мнению M. Roffi и соавт. [1], повышение уровня тропонина в крови у здоровых людей и прежде всего хроническое. Сердечные тропонины преимущественно высокочувствительные ЛБ и играют центральную роль в диагностике и прогнозировании ОКСбпST, а также позволяют дифференцировать ОКСбпST и ОИМ с подъёмом ST [7–9]. По специфичности и чувствительности тропонины превосходят традиционные сердечные ферменты, такие как креатинкиназа, креатинкиназа-МВ и миоглобин [8]. Повышение уровня сердечных тропонинов отражает повреждение кардиомиоцитов, которое при ОКСбпST может быть связано с дистальной эмболизацией тромбоцитарными тромбами, образующимися в области разрыва или эрозии бляшки.

Модель прогнозирования, построенная с включением натрийуретического пептида, имеет отношение риска смертности от ОКС, равное 1,68 при 95% доверительном интервале 1,51–1,88, что составляет 27% от прогноза [10]. Считается, что натрийуретический пептид обладает прогностической информативностью наравне с сердечным тропонином [11]. Отношение рисков смертности при ОКС для гликированного гемоглобина соответствует 1,11 или 19,8% от прогноза, гемоглобина – 1,01 или 2,8% от прогноза, частоты сердечных сокращений – 1,02 или 3,0% от прогноза в целом [10]. Множественный регрессионный анализ показал также, что ОКС достоверно коррелирует с абсолютным изменением частоты дыхания во время сна и является значимым предиктором ОКС [12].

Заключение. Установленная информативность ЛБ крови свидетельствует о ведущей роли тропонина Т, креатинкиназы-МВ и натрийуретического пептида в выявлении ОКСбпST. Высокой диагностической значимостью для ОКСбпST обладают также изоферменты ЛДГ-1 и ЛДГ-2. Созданная регрессионная модель с высокой точностью обеспечивает прогнозирование ОКСбпST. При прогнозировании ОКСбпST следует определять содержание в периферической крови тропонина Т, креатинкиназы-МВ и натрийуретического пептида.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1,4,6-12 см. REFERENCES)

2. Аверков О.В., Тюлькина Е.Е., Павликова Е.П., Мищенко Л.Н., Гордеев И.Г. Острая сердечная недостаточность у больных с острым коронарным синдромом. *Неотложная кардиология*. 2015; 1:30-9.
3. Семенов В.Ю., Горенков Р.В., Мирзонов В.А., Голощачов-Аксенов Р.С. Высотехнологичная медицинская помощь больным острым коронарным синдромом в центральной районной больнице Московской области. *Диагностическая интервенционная радиология*. 2011; 5(3): 79-93.
5. Ардашев А.В., Стаферов А.В., Конев А.В., Афонина Н.С., Негрун Н.И., Химий О.В., Челомбит'ко Е.Г. Современные подходы к диагностике, стратификации риска и интервенционному лечению больных острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST. *Клиническая практика*. 2015; 3-4: 59-84.

REFERENCES

1. Roffi M., Patrono C., Collet J.P. ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *G. Ital. Cardiol. (Rome)*. 2016; 17(10): 831-72.
2. Averkov O.V., Tyul'kina E.E., Pavlikova E.P., Mishhenko L.N., Gordeev I.G. Acute heart failure in patients with acute coronary syndrome. *Neotlozhnaya kardiologiya*. 2015; 1: 30—9. (in Russian)
3. Semenov V.Yu., Gorenkov R.V., Mirzono V.A., Goloschchapov-Aksenov R.S. High-tech medical care for patients with acute coronary syndrome in the central regional hospital of the Moscow region. *Diagnosticheskaya i interventsionnaya radiologiya*. 2011; 5(3): 79-93. (in Russian)
4. Mega J., Braunwald E., Murphy S.A. et al. Rivaroxaban in patients stabilized after a ST-segment elevation myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013; 61:1853-9.
5. Ardashev A.V., Staferov A.V., Konev A.V., Afonina N.S., Negrun N.I., Himiy O.V., Chelombit'ko E.G. Modern approaches to diagnosis, risk stratification and interventional treatment of patients with acute coronary syndrome without ST segment elevation. *Klinicheskaya praktika*. 2015; №3-4: 59-84. (in Russian)
6. Steg P.G., James S.K., Atar D. et al. ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* 2012; 33:2569–2619.
7. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S. et al. Third universal definition of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 2012; 33: 2551–67.
8. Thygesen K., Mair J., Giannitsis E., Mueller C., Lindahl B., Blankenberg S. et al. How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care. *Eur. Heart J.* 2012; 33:2252–7.
9. Mueller C. Biomarkers and acute coronary syndromes: an update. *Eur. Heart J.* 2014; 35:552–6.
10. Savonitto S., Morici N., Nozza A., Cosentino F., PerroneFilardi P., Murena E et al. Predictors of mortality in hospital survivors with type 2 diabetes mellitus and acute coronary syndromes. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 2018; 15(1):14-23.
11. Thygesen K., Mair J., Mueller C. et al. Recommendations for the use of natriuretic peptides in acute cardiac care: a position statement from the study group on biomarkers in cardiology of the ESC working group on acute cardiac care. *Eur. Heart J.* 2012; 33:2001–6.
12. Kiyokuni M., Kawashima C., Konishi M., Sakamaki K., Iwata K., Nakayama N. et al. Relationship between sleep-disordered breathing and renal dysfunction in acute coronary syndrome. *J. Cardiol.* 2018; 71(2):168-73.

Поступила 28.01.18

Принята к печати 03.02.18

ЦИТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 612.014.2.064:613.841.086

Дерюгина А.В.¹, Иващенко М.Н.², Игнатьев П.С.³, Самоделкин А.Г.², Белов А.А.⁴, Гуцин В.А.²

ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНЫХ ЭФФЕКТОВ В БУККАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ ПРИ НАРУШЕНИЯХ АДАПТАЦИОННОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», кафедра физиологии и анатомии, 603950, Нижний Новгород, Россия;

²ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Министерства сельского хозяйства РФ, кафедра физиологии и биохимии животных, 603107, Нижний Новгород, Россия;

³АО «Производственное объединение «Уральский оптико-механический завод им. Э.С. Яламова», 620100, Екатеринбург, Россия;

⁴ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, 603081, Нижний Новгород, Россия

Одним из методов оценки адаптационного статуса организма и ксеногенной интоксикации является цитоморфологическое исследование буккального эпителия. Изучение реактивности клеток буккального эпителия используют для получения информации о генетических изменениях в клетках человека, что крайне необходимо для принятия грамотных решений по вопросам охраны здоровья населения. При курении наблюдается напряжение механизмов адаптации и значительно повышается риск развития цитогенетических нарушений в клетках эпителия слизистой оболочки полости рта. Проведено исследование морфологии буккальных эпителиоцитов курящих юношей. В цитограмме выявлено достоверное снижение числа нормальных клеток, увеличение доли клеток с различными цитогенетическими изменениями. Более чем в два раза чаще встречаются клетки с микроядрами, что является интегративным показателем генетических нарушений в интерфазе. Из клеток с признаками завершения деструкции ядра у курящих достоверно чаще регистрируются клетки с кариорексисом.

Результаты микроядерного теста являются неблагоприятным прогностическим признаком, свидетельствуют о высокой степени генотоксичности табачного дыма, могут говорить о нарушении цитогенетического гомеостаза и снижении адаптационного резерва организма.

Ключевые слова: буккальный эпителий, табачный дым, микроядерный тест, апоптоз, цитоморфология.

Для цитирования: Дерюгина А.В., Иващенко М.Н., Игнатьев П.С., Самоделкин А.Г., Белов А.А., Гуцин В.А. Оценка генотоксичных эффектов в буккальном эпителии при нарушениях адаптационного статуса организма. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63 (5): 290-292. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-290-292>

Deryugina A.V.¹, Ivashchenko M.N.², Ignatiev P.S.³, Samodelkin A.G.², Belov A.A.⁴, Gushchin V.A.²

THE EVALUATION OF GENOTOXIC EFFECTS IN BUCCAL EPITHELIUM UNDER DISORDERS OF ADAPTION STATUS OF ORGANISM

¹The Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Lobachevsky State university of Nizhny Novgorod", 603950, Nizhny Novgorod, Russia

²The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Nizhny Novgorod State Agricultural Academy" of Minselkhoz of Russia, 603950, Nizhny Novgorod, Russia

³The Joint-Stock Company "The Production Association "The E.S. Yalamov Ural Optical Mechanical Plant", 620100, Yekaterinburg, Russia

⁴The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Nizhny Novgorod State Medical Academy" of Minzdrav of Russia, 603081, Nizhny Novgorod, Russia

The cyto-morphologic analysis of buccal epithelium is one of technique of evaluation of adaptation status of organism and xenogeneic intoxication. The analysis of reactivity of cells of buccal epithelium is used to obtain information concerning genetic alterations in human cells that is extremely important for proper decision making related to issues of population health protection. The smoking results in manifestation of tension of adaptation mechanisms and significant increasing of risk of development cytogenetic disorders in cells of buccal epithelium of oral cavity. The study was carried out concerning morphology of buccal epithelial cells of smoking youths. The cytogram demonstrated a reliable decreasing of number of normal cells and increasing of percentage of cells with various cytogenetic alterations. The cells with micro-nuclei are observed twice more often that can be considered as an integral indicator of genetic disorders in inter phase. In smokers, among cells with signs of completion of nucleus destruction the cells with karyorrhesis are registered reliably more often. The results of micro-nucleus test are an unfavorable prognostic indication testifying high degree of genotoxicity of tobacco smoke and meaning a disorder of cytogenetic homeostasis and decreasing of adaptation reserve of organism.

Key words: buccal epithelium; tobacco smoke; micro-nucleus test; apoptosis; cytomorphology.

For citation: Deryugina A.V., Ivashchenko M.N., Ignatiev P.S., Samodelkin A.G., Belov A.A., Gushchin V.A. The evaluation of genotoxic effects in buccal epithelium under disorders of adaption status of organism. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(5): 290-292. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-290-292>

For correspondence: Ivashchenko M.N., associate professor of the chair of Physiology and Biochemistry of Animals of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Nizhny Novgorod State Agricultural Academy", e-mail: mi11207@rambler.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.12.2017
 Accepted 16.01.2018

Введение. Функциональные параметры зрелых клеток эпителия полости рта (в частности, буккального) регулируются факторами местного и центрального происхождения, и их состояние отражает характер дестабилизационных процессов на местном и системном (дистантном) уровнях [1]. Исследование микроядерного теста буккального эпителия является методом оценки адаптационного статуса организма и ксеногенной интоксикации. Кроме того, изучение реактивности клеток буккального эпителия используют для получения информации о генетических изменениях в клетках человека. Оценка генотоксичности различных эндогенных факторов крайне необходима для принятия грамотных решений по вопросам охраны здоровья населения [2].

Напряжение механизмов адаптации наблюдается при курении. Буккальный эпителий ротовой полости в силу своих анатомо-топографических особенностей первым подвергается воздействию курения. Различные компоненты, входящие в состав табачного дыма негативно влияют на строение, функции слизистой оболочки полости рта и рассматриваются как этиологические факторы предрака с последующей малигнизацией. Показано, что курение значительно повышает риск развития цитогенетических нарушений в клетках эпителия слизистой оболочки полости рта, перевода курящего из группы умеренного риска в группу высокого риска [3]. Цитоморфологически это выражается в двукратном повышении числа клеток с признаками нарушения процесса пролиферации и клеток с признаками деструкции по типу некроза. Однако данные исследования затрагивают лиц юношеского возраста со стажем курения до 5 лет [4]. Представляется крайне важным оценка генотоксических эффектов на организм человека длительного воздействия табачного дыма при курении, как фактора вызывающего значительные нарушения адаптационных процессов и причин многих тяжелых заболеваний.

Целью работы ставилось изучение влияния табакокурения на буккальные эпителиоциты юношей со стажем курения более 5 лет.

Материал и методы. В ходе проведенного исследования был выполнен микроядерный анализ буккального эпителия у 18 юношей. Экспериментальную группу составили девять юношей в возрасте от 20 до 26 лет со стажем курения 5-7 лет, которые выкуривали 10-12 сигарет в сутки. Контрольную группу составили девять некурящих юношей того же возраста. Забор материала производили в одно и то же время.

В исследование не включались молодые люди, страдающие соматической патологией, со стоматологическими проблемами, злоупотребляющие алкогольными

напитками, а также с неблагоприятным аллергоанамнезом.

Эпителий забирался шпателем с последующим переносом на предметное стекло и высушиванием при открытом доступе воздуха в течение 35 минут. Окраску материала проводили по Гимзе — Романовскому, с последующим микроскопическим анализом на микроскопе «Олимпус» при увеличении $100 \times 1,5 \times 1,0$. От каждого обследованного было проанализировано не менее 1000 нормальных эпителиоцитов.

На препаратах учитывали цитогенетические показатели (клетки с микроядрами и атипичной формой ядра), показатели пролиферации (двумя и более ядрами), показатели деструкции ядра.

Математическая обработка проведена методом вариационной статистики с расчетом среднего значения (M), ошибки средней (m) и определением достоверности различий по t-критерию Стьюдента. Статистический анализ полученных результатов выполняли с использованием программы Microsoft Exel и пакета прикладных программ Statistika версия 6.0.

Результаты. В таблице отображено среднее число клеток из 1000 учтенных в поле зрения, в том числе с выявленными патологиями ядра. В биоматериале экспериментальной группы выявлено статистически значимо меньше клеток нормы и больше клеток с разными признаками цитоморфологических патологий, чем у контрольной группы обследуемых. В частности, клеток с морфологически нормальными ядрами у курящих в три раза меньше, чем у некурящих.

Цитогенетические аномалии клеток буккального эпителия у представителей экспериментальной группы зарегистрированы чаще, чем у представителей контрольной группы ($p < 0,05$). В первую очередь это касается клеток с микроядрами. Увеличение числа клеток

Особенности цитоморфологии клеток буккального эпителия у курящих и некурящих лиц (среднее число клеток из 1000 учтенных в поле зрения)

Цитоморфологические показатели	Экспериментальная группа	Контрольная группа
норма	95,11±19,07*	317,09±44,09
микроядерность	102,39±4,19*	58,68±7,49
атипичная форма ядра	74,29±4,42*	31,69±4,58
двужядерность	78,09±4,39*	47,51±5,07
вакуолизация ядра	49,38±5,28*	10,28±3,27
кариорексис	59,24±4,14*	30,77±5,90
кариопикноз	69,35±8,15	76,24±9,01
кариолизис	94,78±5,30	89,28±7,05

Примечание: * – достоверное различие с показателями контрольной группы.

с микроядрами считается интегративным показателем генетических нарушений в интерфазных ядрах у лиц, подверженных генотоксическим и цитотоксическим воздействиям экзогенных факторов. По данным Д. А. Ильина [5], появление многоядерных клеток в организме является результатом слияния друг с другом нескольких клеток или результатом нарушения самого процесса цитотомии, что связано с влиянием стрессирующих факторов внешней среды. По данным Л. В. Китаевой [6], микроядра образуются в результате нарушения клеточного деления или фрагментации ядра. Причинами формирования микроядер могут служить воздействия тяжелых металлов, входящих в состав табачного дыма, в ряде работ, микроядерность рассматривается как ранний признак онкопроцесса [4].

Клетки с атипичной формой ядра встречались в цитограммах курящих в два раза чаще, чем у некурящих. Возможной причиной формирования атипичной формы ядра являются хромосомные мутации. Морфологические признаки нарушения пролиферации в полтора раза чаще отмечены в биоматериале представителей экспериментальной группы. Увеличение количества двуядерных клеток буккального эпителия, является результатом полиплоидизирующего ацитокINETического митоза, представляя собой естественный ответ на экотоксичность. Возрастная частота встречаемости двуядерных клеток в буккальном эпителии по сравнению с контрольной группой свидетельствует о низкой эффективности работы механизма программируемой гибели клеток (апоптоза), призванного элиминировать дефектный генетический материал, что служит неблагоприятным прогностическим признаком [7] и может свидетельствовать о высокой степени генотоксичности табачного дыма.

О нарушении естественной стимуляции процессов апоптоза буккальных эпителиоцитов путем воздействия цитотоксических и генотоксических экзогенных факторов свидетельствует признак завершения деструкции ядра - статистически значимое повышение количества клеток с кариорексисом у курящих юношей.

Заключение. Результаты микроядерного теста являются неблагоприятным прогностическим признаком и свидетельствуют о высокой степени генотоксичности табачного дыма при длительном курении (5 и более лет). Цитогенетические нарушения в буккальном эпителии у курящих лиц, могут говорить о нарушении цитогенетического гомеостаза, снижении адаптационного резерва и иммунного статуса организма, что, в свою очередь, может рассматриваться как состояние предболезни.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цепов Л.М., Левченков Н.С., Золотарева О.Н. Цитогенетические показатели и электрокинетическая подвижность ядер клеток буккального эпителия в оценке состояния пародонта. *Стоматология*. 1999; 3: 7—8.
2. Левински М.В., Калаев В.Н., Буторина А.К. Анализ встречаемости клеток с микроядрами в буккальном эпителии и уровень сывороточных антител среди детского и взрослого населения, проживающего в различных районах города Кишинева. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2008; 2: 12-7.
3. Шилова Ю. Н. Профилактика заболеваний слизистой оболочки полости рта у курящих лиц с использованием озона: Дис. ... канд. мед наук. Новосибирск; 2007.
4. Молокова Ю. П. Особенности цитоморфологии буккального эпителия курящих лиц юношеского возраста. *Вестник МГОУ. Серия: Естественные науки*. 2017; 1: 21-30.
5. Ильин Д. А. *Многоядерные макрофаги*. Новосибирск: Наука; 2011.
6. Китаева Л.В., Михайлова И.А., Семов Д.М. Мукоциты с микроядрами и обсемененность кокковыми формами *Helicobacter pylori* в слизистой оболочке желудка человека. *Цитология*. 2008; 2: 160-4.
7. Петрашова Д.А., Белишева Н.К., Пелевина И.И. Генотоксические эффекты в буккальном эпителии горняков, работающих в условиях облучения природными источниками ионизирующего излучения. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2011; 13: 1792-6.

REFERENCES

1. Tsepov L.M., Levchenkov N.S., Zolotareva O.N. Cytogenetic indices and the electrokinetic mobility of the nuclei of cells of buccal epithelium in the assessment of periodontal. *Stomatologija*. 1999; 3: 7—8. (in Russian)
2. Levinski M.V., Kalaev V.N., Butorina A.K. Analysis of frequency of cells with micronuclei in bukkalno epithelium and the levels of serum antibodies among children and adults living in different parts of the city of Chisinau. *Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik "Chelovek i ego zdorov'e"*. 2008; 2: 12-7. (in Russian)
3. Shilova Ju. N. Prevention of diseases of the mucosa of the oral cavity in smokers with ozone: Diss. [Profilaktika zabolevanij slizistoj obolochki polosti rta u kurjashhih lic s ispol'zovaniem ozona]. Dis. Novosibirsk; 2007. (in Russian)
4. Molokova Ju.P. Features, cytomorphy of buccal epithelium of smokers of teenagers. *Vestnik MGOU. Serija: Estestvennye nauki*. 2017; 1: 21-30. (in Russian)
5. Il'in D. A. *Multinucleated macrophages* [Mnogojadernye makrofa-gi]. Novosibirsk: Nauka; 2011. (in Russian)
6. Kitaeva L.V., Mihajlova I.A., Semov D.M. The mucosal with micronuclei and the colonization of coccal forms of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of man. *Tsitologija*. 2008; 2: 160-4. (in Russian)
7. Petrashova D.A., Belisheva N.K., Pelevina I.I. Genotoxic effects in bukkalno epithelium of miners working in conditions of exposure to natural sources of ionizing radiation. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*. 2011; 13: 1792-6. (in Russian)

Поступила 15.12.17

Принята к печати 16.01.18

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.276.2/.4.03:617.52-002.36

Платонова В.В., Севбитов А.В., Шакарьянц А.А., Дорофеев А.Е.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ОДОНТОГЕННЫМИ ФЛЕГМОНАМИ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ПРЕПАРАТА ДАЛАРГИН

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

Пациенты с одонтогенными флегмонами челюстно-лицевой области испытывают иммунодепрессию на хирургическом этапе лечения, что может неблагоприятно сказаться на их реабилитации. Исследуется возможность применения препарата Даларгин в комплексном лечении пациентов в послеоперационном периоде. В экспериментальном исследовании были определены звенья иммунитета, на которые воздействует препарат. После этого в клинической практике Даларгин был применён у пациентов со среднетяжёлым течением заболевания. Доказаны иммуномодулирующие свойства Даларгина, которые действуют на различные фракции субпопуляций лимфоцитов и проявляются в виде снижения исходно высоких и повышения исходно низких показателей, что имеет важное значение при лечении больных одонтогенными флегмонами, особенно при тяжёлом течении заболевания.

Ключевые слова: одонтогенные флегмоны; иммунитет; гнойная хирургия; челюстно-лицевая область.

Для цитирования: Платонова В.В., Севбитов А.В., Шакарьянц А.А., Дорофеев А.Е. Экспериментально-клиническое обоснование лечения больных с одонтогенными флегмонами челюстно-лицевой области с использованием в комплексной терапии препарата «Даларгин». Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63(5): 293-296. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-293-296>

Platonova V.V., Sevbitov A.V., Shakaryants A.A., Dorofeev A.E.

THE EXPERIMENTAL CLINICAL SUBSTANTIATION OF TREATMENT OF PATIENTS WITH ODONTOGENIC PHLEGMON OF MAXILLOFACIAL AREA USING DELARGIN IN COMPLEX THERAPY

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

The patients with odontogenic phlegmon of maxillofacial area suffer from immune depression at the surgical stage of treatment that can unfavorably affect their rehabilitation. The study analyzes possibility of application of medication Dalargin in complex treatment of patients during post-operation period. The experimental study established components of immune system affected by medication. Thereupon, Dalargin was applied in clinical practice of treatment of patients with course of disease of average severity. The study proved immunomodulatory characteristics of Dalargin effecting various fractions of sub-populations of lymphocytes and manifesting by way of decreasing of initially high indices and increasing of initially low indices that is of great importance during treatment of patients with odontogenic hormones, especially in case of severe course of disease.

Key words: odontogenic phlegmon; immunity; contaminated surgery; maxillofacial area.

For citation: Platonova V.V., Sevbitov A.V., Shakaryants A.A., Dorofeev A.E. The experimental clinical substantiation of treatment of patients with odontogenic phlegmon of maxillofacial area using Dalargin in complex therapy. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(5): 293-296. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-293-296>

For correspondence: Dorofeev A.E. assistant of the chair of propaedeutics of stomatological diseases of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "The I.M. Sechenov First Moscow State Medical University", e-mail: aedorofeev@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 26.12.2017
Accepted 16.01.2018

Гнойные поражения мягких тканей челюстно-лицевой области, как и прежде, находятся в центре внимания хирургов-стоматологов, так как несмотря на

значительный объём проводимых профилактических и лечебных мероприятий, роль осложнённого кариеса и пародонтита в их развитии остаётся значительной.

Кроме того, увеличивается число тяжело протекающих и атипичных форм данной патологии, что часто представляет угрозу для жизни пациентов. Многообразие причинно-следственных связей, обуславливаю-

Для корреспонденции: Дорофеев Алексей Евгеньевич, ассистент каф. пропедевтики стоматологических заболеваний; e-mail: aedorofeev@mail.ru

ших этот факт, связано с социальными, экологическими условиями, снижением на этом фоне антиинфекционной резистентности макроорганизма, качественными изменениями биологических свойств гнойной флоры под влиянием необоснованного применения антибиотиков, гормональных средств и других лекарственных препаратов, снижающих иммунитет, увеличением числа сопутствующих заболеваний и высокой предрасположенностью населения к аллергии.

В настоящее время достигнуты значительные успехи в лечении одонтогенных гнойно-воспалительных заболеваний лица и шеи, обоснованы основные принципы хирургического и медикаментозного лечения. Однако их эффективность всё ещё не обеспечивает в достаточной степени совокупный сомогенетический эффект, а направлены они в основном на восстановление факторного проявления острого воспаления. Возможно, этим объясняется многочисленность существующих в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии вариантов лечения указанной патологии.

С учётом вышесказанного представляется интересным включение в комплексную терапию гнойно-воспалительных заболеваний средств, которые оказывали бы широкий спектр противовоспалительного действия, имея в то же время специфическую направленность как на отдельные патогенетические звенья, так и на патологический процесс в целом. Одним из представителей данной группы медикаментозных средств является Даларгин – синтетический аналог регулярных пептидов [1].

Известно, что регуляторные пептиды выполняют важную роль в организме: регулируют деятельность гипофиза, контролирующего функции многих эндокринных желёз, влияют на механизмы восприятия болевых импульсов, деятельность сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта, т. е. характеризуются широким спектром действия практически на все функции человеческого организма [2, 6].

Действие регуляторных пептидов может быть прямым (при влиянии на определённые рецепторы), а также опосредованным, когда они выступают в роли нейротрансмиттеров и нейромодуляторов. Именно этим объясняется всё многообразие их биологической активности [4, 5].

Даларгин – синтетический аналог регуляторных пептидов (лей-энкефалина) разработан в нашей стране. Он успешно прошёл клинические испытания в качестве противоязвенного средства. Экспериментальные и клинические испытания продемонстрировали широчайший спектр его биологической активности: препарат снижает артериальное давление, влияет на содержание катехоламинов при экспериментальном инфаркте миокарда, снижает избыточное поступление кальция в клетку, обладает антиоксидантной активностью и пр. [7, 9].

Одной из наиболее интересных сторон биологической активности Даларгина является его влияние на иммунологический статус. Он резко усиливает митотическую активность лимфоцитов периферической крови, стимулирует

бластогенез мононуклеарных клеток при снижении их пролиферативной активности и, наоборот, ингибирует ответ мононуклеаров при высоком уровне пролиферации. Препарат увеличивает в крови число Т-розеткообразующих клеток (Т-РОК), не влияя на общее количество лимфоцитов, т. е. обладает иммунорегуляторными свойствами. Под воздействием Даларгина установлено усиление хемотаксиса макрофагов и их фагоцитарной активности, возрастание митотической активности фибробластов и активация дегрануляции тучных клеток, ускорение созревания грануляционной ткани и процесса эпителизации [3, 8].

Всё вышперечисленное наглядно свидетельствует о широком спектре биологической активности Даларгина и возможной целесообразности его применения в челюстно-лицевой области при одонтогенных флегмонах.

Цель исследования – в ходе эксперимента выявить, на какие звенья иммунного ответа воздействует Даларгин.

Материал и методы. В клинической практике выбор иммунокорректирующего препарата обычно обусловлен либо его специфическим действием на то или иное нарушенное звено, либо широтой неспецифического отклика на ряд звеньев иммунитета, что в urgentной хирургии предпочтительнее.

В предварительных исследованиях было установлено, что у лиц с одонтогенными флегмонами наиболее значительные нарушения обнаружены в соотношении субпопуляций Т-лимфоцитов (Тх и Тс) и системе фагоцитоза. Первоочередной задачей перед применением Даларгина в клинике необходимо было выяснить, на какие звенья иммунного ответа у больных одонтогенными флегмонами он воздействует. Эти исследования проводили экспериментально (*in vitro*).

У больных одонтогенными флегмонами челюстно-лицевой области с легкой, средней и тяжелой степенью течения процесса (по 10 человек из каждой группы) взятую на исследование лейкоцитарную взвесь в концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл разливали по 0,1 мл в 12 пробирок.

В 1-ю пробирку добавляли 0,1 мл 0,6% взвеси эритроцитов барана в среде 199; во 2-ю – 0,05 мл телячьей сыворотки, инактивированной при 56°C и адсорбированной лейкоцитами человека с группой крови АВ0, и 0,1 мл 0,65% взвеси эритроцитов мыши линии СВА в среде 199; в 3-ю – 0,1 мл теофиллина. После термостатирования в течение 1 ч в пробирку добавляли 0,1 мл 0,6% взвеси эритроцитов быка. В 4-ю (контрольную) пробирку для определения процентного содержания теофиллинчувствительных, теофиллинрезистентных клеток вместо теофиллина добавляли среду 199. В остальные пробирки ингредиенты вводили соответственно 1, 2, 3 и 4-й пробиркам, но после предварительной инкубации лейкоцитарной суспензии в течение 30 мин с 0,1 мл Даларгина, разведённого до 10^{-6} и 10^{-8} мг/мл средой 199.

Препарат с РОК окрашивали в течение 4 мин красителем Мая–Грюнвальда.

При постановке теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) использовали 0,2% раствор НСТ на фосфатном буфере с рН 7,2.

Для определения фармазона в цитоплазме клеток препараты окрашивали 1% раствором метиленового синего (2 мин). Вычисляли процент положительных НСТ-клеток и цитологический показатель

Таблица 1

Определение звеньев иммунного ответа у пациентов с легкой степенью течения заболевания

Концентрация Даларгина	Иммунологические показатели					
	В-лимфоциты	Т-резистентные лимфоциты	Т-чувствительные лимфоциты	Т-лимфоциты	Е-РОК	ЦПА
10^{-8}	75,4 ± 3,5	16,7 ± 2,2	62,3 ± 6,8	11,7 ± 5,41	45,8 ± 5,3	1,33 ± 0,26
10^{-6}	73,7 ± 3,4	17,1 ± 2,8	64,5 ± 4,3	12,0 ± 3,2	49,8 ± 4,7	1,75 ± 0,05

Определение звеньев иммунного ответа у пациентов со средней степенью течения заболевания

Концентрация Даларгина	Иммунологические показатели					
	В-лимфоциты	Т-резистентные лимфоциты	Т-чувствительные лимфоциты	Т-лимфоциты	Е-РОК	ЦПА
10 ⁻⁸	73,1 ± 3,8	16,7 ± 2,2	62,3 ± 6,8	11,7 ± 5,41	45,8 ± 5,3	1,33 ± 0,26
10 ⁻⁶	66,2 ± 2,1	12,3 ± 1,7	51,8 ± 3,3	13,4 ± 4,5	38,7 ± 3,1	0,88 ± 0,09

Определение звеньев иммунного ответа у пациентов с тяжелой степенью течения заболевания

Концентрация Даларгина	Иммунологические показатели					
	В-лимфоциты	Т-резистентные лимфоциты	Т-чувствительные лимфоциты	Т-лимфоциты	Е-РОК	ЦПА
10 ⁻⁸	73,8 ± 9,6	15,6 ± 3,5	64,8 ± 7,3	7,7 ± 2,7	52,9 ± 6,8	1,6 ± 0,21
10 ⁻⁶	77,9 ± 6,4	13,2 ± 3,8	54,4 ± 5,9	28,4 ± 4,82	4,3 ± 6,2	0,7 ± 0,08

активности (ЦПА) по степени отложения фармазона в клетках до и после инкубации лейкоцитов (15 мин) при 37°C, а затем (15 мин) при комнатной температуре во влажной камере с двумя концентрациями Даларгина и без него.

В клинические исследования были включены 40 человек – 25 (62,5%) мужчин и 15 (37,5%) женщин: 17 (42,5%) со среднетяжелым течением воспаления и 23 (57,5%) с тяжелым его течением. Средний возраст пациентов варьировал от 30 до 50 лет.

Больных отбирали при исходно сниженном количестве Т-лимфоцитов и увеличении В-лимфоцитов, нарушении соотношения Тх/Тс, высоком ЦПА НСТ-теста.

У всех пациентов одновременно с исследованием иммунологических показателей реактивности проводили тестирование с высокими и низкими концентрациями Даларгина (10⁻⁶ и 10⁻⁸) для определения индивидуальной реакции на препарат. Увеличение показателей Е-РОК нейтрофилов, активность восстановления НСТ в лейкоцитах и моноцитах, повышение Т-чувствительных и Т-резистентных лимфоцитов в нагрузочных тестах являлись показателями к назначению препарата.

Даларгин назначали с момента получения данных иммунологического исследования в течение 5 дней по

2 раза в день, внутримышечно, из расчета 10 мг/кг массы. Одновременно с введением препарата проводилось общепринятое противовоспалительное и симптоматическое лечение. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием критерия Стьюдента и коэффициента корреляции.

Результаты. Результаты экспериментального исследования представлены в табл. 1 (легкая степень течения воспалительного процесса), табл. 2 (средняя степень

течения) и табл. 3 (тяжелая степень течения). Представленные данные изучения действия Даларгина свидетельствуют о том, что основным показанием для назначения препарата является увеличение в нагрузочных тестах показателей Е-РОК нейтрофилов и ЦПА восстановления НСТ в лейкоцитах периферической крови, а также повышение исходно низкого содержания Т- и В-лимфоцитов.

Кроме того, как видно из полученных в экспериментальных исследованиях данных, основным клиническим показанием для назначения Даларгина являются воспалительные заболевания со среднетяжелым и тяжелым течением воспалительного процесса, так как у пациентов с легкой степенью течения происходит саморегуляция иммунных показателей. Для предотвращения возможного «срыва» регуляторных механизмов восстановления иммунитета под воздействием Даларгина целесообразно проведение предварительных нагрузочных проб, особенно у пациентов с тяжелым течением вследствие большого истощения у них резервных сил организма.

Результаты лечения пациентов препаратом Даларгин представлены в табл. 4 и 5.

Как видно из табл. 4, по мере применения Даларгина у пациентов со средней тяжестью течения воспалительного процесса отмечается постепенное снижение относительно

Таблица 4

Динамика иммунологических показателей у больных с течением заболевания средней тяжести

Иммунологический показатель	Значение показателя у практически здоровых	Значение исследуемого показателя в сутки наблюдения:			
		2-е	5-е	7-е	перед выпиской
Лейкоциты, абс.	4,3 – 7,5 · 10 ⁹ /л	10,6 ± 4,31 · 10 ⁹ /л	9,7 ± 5,3 · 10 ⁹ /л	9,1 ± 4,75 · 10 ⁹ /л	8,1 ± 3,67 · 10 ⁹ /л
Лимфоциты, абс., %	2,2 · 10 ⁹ /л, 28 ± 2,9	1,62 ± 3,14 · 10 ⁹ /л, 20,36 ± 1,54	1,8 ± 1,72 · 10 ⁹ /л, 22,73 ± 0,73	2,071 ± 2,43 · 10 ⁹ /л, 25,94 ± 1,5	25 ± 1,37 · 10 ⁹ /л, 31,15 ± 8,1
Т-лимфоциты (Е-РОК), абс., %	1,0–1,2 · 10 ⁹ /л, 58–67	0,5 ± 0,07 · 10 ⁹ /л, 51,2 ± 4,1	0,48 ± 0,01 · 10 ⁹ /л, 48,3 ± 5,6	0,44 ± 0,03 · 10 ⁹ /л, 44,4 ± 5,6	0,42 ± 0,003 · 10 ⁹ /л, 42,1 ± 4,7
Т-хелперы (теофиллинрезистентные), абс., %	0,7–0,85 · 10 ⁹ /л, 35–48	0,99 ± 0,03 · 10 ⁹ /л, 66,75 ± 7,31	0,97 ± 0,1 · 10 ⁹ /л, 64,7 ± 7,3	0,87 ± 0,03 · 10 ⁹ /л, 58,3 ± 7,7	0,79 ± 0,4 · 10 ⁹ /л, 53,1 ± 5,3
Т-супрессоры, абс., %	0,27–0,54 · 10 ⁹ /л, 18–25	0,13 ± 0,007 · 10 ⁹ /л, 8,7 ± 1,65	0,15 ± 0,001 · 10 ⁹ /л, 10,31 ± 1,87	0,2 ± 0,005 · 10 ⁹ /л, 15,6 ± 2,31	0,24 ± 0,007 · 10 ⁹ /л, 26,5 ± 2,4
Иммунорегуляторный индекс (Тх/Тс)	1,4–2	7,7	6,3	3,7	2,0
В-лимфоциты (М-РОК), абс., %	0,1–0,2 · 10 ⁹ /л, 5–7	0,3 ± 0,007 · 10 ⁹ /л, 15,3 ± 2,75	0,3 ± 0,015 · 10 ⁹ /л, 15,37 ± 3,03	0,2 ± 0,003 · 10 ⁹ /л, 13,7 ± 2,84	0,2 ± 0,015 · 10 ⁹ /л, 12,3 ± 1,41
Иммуноглобулин А, мг%	162 ± 18	76,5 ± 8,3	70,3 ± 5,3	67,1 ± 6,3	64 ± 4,11
Иммуноглобулин М, мг%	119 ± 18	84,3 ± 6,7	92,7 ± 10,1	98,2 ± 11,4	115,7 ± 17,1
Иммуноглобулин Е, мг%	1610 ± 42	1260 ± 11,4	1300 ± 0,7	1432 ± 17,4	1550 ± 17,1
ЦПА-НСТ-тест, усл. ед.	0,2	1,58 ± 0,3	1,44 ± 0,19	0,92 ± 0,15	0,85 ± 0,07

Динамика иммунологических показателей у больных с тяжелым течением болезни

Иммунологический показатель	Значение показателя у практически здоровых	Значение исследуемого показателя в сутки наблюдения:			
		2-е	5-е	7-е	перед выпиской
Лейкоциты, абс.	4,3–7,5·10 ⁹ /л	14,3 ± 4,8·10 ⁹ /л	13,7 ± 1,31·10 ⁹ /л	10,3 ± 4,6·10 ⁹ /л	7,4 ± 3,5·10 ⁹ /л
Лимфоциты, абс., %	2,2·10 ⁹ /л, 28 ± 2,9	1,18 ± 1,37·10 ⁹ /л, 14,76 ± 2,03	1,38 ± 1,41·10 ⁹ /л, 17,32 ± 1,74	1,6 ± 1,65·10 ⁹ /л, 20,3 ± 4,28	25 ± 1,37·10 ⁹ /л, 30,7 ± 11,9
T-лимфоциты (E-РОК), абс., %	1,0–1,2·10 ⁹ /л, 58–67	0,5 ± 0,01·10 ⁹ /л, 51,2 ± 6,25	0,4 ± 0,003·10 ⁹ /л, 48,27 ± 5,21	0,44 ± 0,008·10 ⁹ /л, 44,3 ± 5,21	0,42 ± 0,004·10 ⁹ /л, 42,1 ± 4,8
T-хелперы (теофиллинрезистентные), абс., %	0,7–0,85·10 ⁹ /л, 35–48	0,96 ± 0,003·10 ⁹ /л, 64,3 ± 7,5	0,93 ± 0,01·10 ⁹ /л, 62,5 ± 5,73	0,86 ± 0,003·10 ⁹ /л, 57,9 ± 6,3	1,3 ± 0,31·10 ⁹ /л, 54,4 ± 5,9
T-супрессоры, абс., %	0,27–0,54·10 ⁹ /л, 18–25	0,11 ± 0,0009·10 ⁹ /л, 7,7 ± 3,1	25,03 ± 0,003·10 ⁹ /л, 16,75 ± 3,8	0,29 ± 0,001·10 ⁹ /л, 19,8 ± 4,5	0,34 ± 0,01·10 ⁹ /л, 22,9 ± 3,6
Иммунорегуляторный индекс (Тх/Тс)	1,4–2	8,3	3,7	2,9	2,3
В-лимфоциты (M-РОК), абс., %	0,1–0,2·10 ⁹ /л, 5–7	0,31 ± 0,006·10 ⁹ /л, 15,71 ± 3,48	0,29 ± 0,014·10 ⁹ /л, 14,84 ± 4,52	0,28 ± 0,014·10 ⁹ /л, 14,1 ± 3,8	0,26 ± 0,003·10 ⁹ /л, 13,2 ± 3,65
Иммуноглобулин А, мг%	162 ± 18	74 ± 6,11	86 ± 1,15	97,4 ± 6,4	135 ± 4,3
Иммуноглобулин М, мг%	119 ± 18	75,6 ± 4,3	89,4 ± 5,1	100,4 ± 7,4	115,7 ± 8,3
Иммуноглобулин Е, мг%	1610 ± 42	1041 ± 11,2	1138 ± 6,9	1308 ± 6,8	1480 ± 12,4
ЦПА-НСТ-тест, усл. ед.	0,2	1,6 ± 0,21	1,3 ± 0,31	0,89 ± 0,34	0,68 ± 0,05

исходных данных количества В-лимфоцитов, Т-хелперов, E-РОК, ЦПА, тогда как Т-чувствительная фракция возрастает. Из табл. 5 следует, что у больных с тяжелым течением воспаления на фоне лечения Даларгином наблюдается возрастание теофиллинчувствительной субпопуляции и снижение ЦПА-НСТ-теста. Представленные данные говорят о целесообразности использования Даларгина у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области в качестве иммунокорректора.

Обсуждение. Таким образом, основной целью экспериментального исследования с препаратом Даларгин было определение, на какие звенья иммунного ответа он оказывает действие. При этом установлено, что показанием к применению препарата является снижение у больных с одонтогенными флегмонами активности Т-лимфоцитов, сочетанная недостаточность Т- и В-систем иммунитета и функциональной активности нейтрофилов.

Заключение. Использование препарата Даларгин по указанной схеме восстанавливает указанные нарушения. Однако во избежание у больных «срыва» компенсаторных механизмов иммунологической защиты назначать препарат лучше после проведения предварительных нагрузочных проб для определения индивидуальной чувствительности и ответной реакции на Даларгин. Однако если учесть тот факт, что Даларгин оказывает многофакторное воздействие на макроорганизм, предварительная постановка нагрузочных проб не является обязательной. Даже при отсутствии эффекта иммунологического воздействия препарат не оказывает отрицательного влияния на организм, а способствует коррекции деятельности систем организма, нарушенных воспалительным процессом, и заживлению операционной раны.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 5-10 см. REFERENCES)

1. Булгаков С.А. Гексапептид даларгин в клинической гастроэнтерологии: 30-летний опыт использования препарата. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2016; 26 (3): 103-12.

3. Черпаков Р.А., Гребенчиков О.А., Плотников Е.Ю., Лихванцев В.В. Сравнительная эффективность фармакологического preconditionирования на основе даларгина и лития на модели гентамициновой нефротоксичности. *Анестезиология и реаниматология*. 2015; 60(1): 58-63.
4. Донцов А.В. Антиоксидантный эффект даларгина у пациентов с ишемической болезнью сердца и метаболическим синдромом. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2015; 78(7): 3-6.

REFERENCES

1. Bulgakov S.A. Hexapeptide dalargin in clinical gastroenterology: 30 years of experience in the use of the drug. *Rossiiskii zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2016; 26 (3): 103-12. (in Russian)
2. Abbood A., Smadja C., Taverna M., Herrenknecht C. Hydrophilic interaction liquid chromatography for dalargin separation from its structural analogues and side products. *J. Chromatogr. A*. 2017; May 19; 1498: 155-62.
3. Cherpakov R.A., Grebenchikov O.A., Plotnikov E.J., Likhvantsev V.V. Comparison of pharmacological renal preconditioning with dalargin and lithium ions in the model of gentamicin-induced acute renal failure. *Anesteziologya I Reanimatologiya*. 2015; 60(1): 58-63. (in Russian)
4. Dontsov A.V. The antioxidant effect of dalargin in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome. *Ekspierimetal'naya klinicheskaya farmakologiya*. 2015; 78(7): 3-6 (in Russian)
5. Eskandari S., Guerin T., Toth I., Stephenson R.J. Recent advances in self-assembled peptides: Implications for targeted drug delivery and vaccine engineering. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2017(Feb); 110-11: 169-87.
6. Mazza M., Notman R., Anwar J., Rodger A., Hicks M., Parkinson G. et al. Nanofiber-based delivery of therapeutic peptides to the brain. *ACS Nano*. 2013; 26; 7(2): 1016-26.
7. Pinaeva O.G., Sazonova E.N., Lebed'ko O.A., Timoshin S.S. Correction of Negative Effect of Antenatal Hypoxia on Liver Tissue Homeostasis in Newborn Albino Rats with Opioid Peptides. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016 Dec; 162(2): 203-6.
8. Plotnikov E.Y., Grebenchikov O.A., Babenko V.A., Pevzner I.B., Zorova L.D., Likhvantsev V.V., Zorov D.B. Nephroprotective effect of GSK-3β inhibition by lithium ions and δ-opioid receptor agonist dalargin on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* 2013; 220 (3): 303-8.
9. Zupančič O., Rohrer J., Thanh Lam H., Griebinger J.A., Bernkop-Schnürch A. Development and in vitro characterization of self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for oral opioid peptide delivery. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 2017 ; 43(10): 1694-1702.

Поступила 26.12.17

Принята к печати 16.01.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.721-002-092:612.017.1]-078.33

Кузнецова Д.А.¹, Лапин С.В.¹, Гайдукова И.З.², Ребров А.П.³, Маслянский А.Л.⁴

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ АУТОАНТИТЕЛ К CD74 ПРИ АКСИАЛЬНЫХ СПОНДИЛОАРТРИТАХ

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава РФ, 197015, Санкт-Петербург;

³ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ, 410012, Саратов;

⁴ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, 197341, Санкт-Петербург

Современные диагностические подходы позволяют диагностировать аксиальные спондилоартриты (аксСпА) в рентгенологической стадии, соответствующей анкилозирующему спондилиту (АС), в то время как ранняя диагностика нерентгенологических аксСпА (nr-аксСпА) по-прежнему затруднительна. Это обуславливает потребность в поиске новых лабораторных биомаркеров для ранней диагностики спондилоартритов, к числу которых относятся недавно описанные аутоантитела к антигену CD74. Целью данного исследования была оценка клинико-диагностической значимости аутоантител IgA к антигену CD74 при аксСпА. Методом количественного иммуноферментного анализа мы измеряли содержание аутоантител IgA к CD74 в образцах сывороток 140 пациентов с аксСпА: 68 – с АС, 46 – с nr-аксСпА, 26 – с псориатическим артритом (ПсА) и 37 здоровых представителей контрольной группы, у которых клинически полностью были исключены признаки аксСпА. Средние значения концентрации аутоантител IgA к CD74 у пациентов с аксСпА и nr-аксСпА составили $3,5 \pm 3,0$ и $3,8 \pm 2,9$ Ед/мл соответственно, что достоверно значимо отличалось от пациентов с ПсА и здоровых лиц – $2,1 \pm 1,4$ и $1,3 \pm 1,4$ Ед/мл соответственно ($p < 0,05$). При пороговом значении содержания аутоантител IgA к CD74 более 2,0 Ед/мл при аксСпА диагностическая чувствительность составила 64,4%, специфичность – 89,2%, фактор риска положительного результата – 5,9, тогда как у пациентов с nr-аксСпА при концентрации 1,7 Ед/мл – 73,1%, 84% и 4,5 соответственно. Аутоантитела IgA к антигену CD74 ассоциированы с аксСпА, но не с ПсА, что позволяет использовать данный маркер для диагностики аксиальных спондилоартритов, а также при проведении дифференциальной диагностики между аксСпА и ПсА.

Ключевые слова: аксиальный спондилоартрит; анкилозирующий спондилит; антитела IgA к антигену CD74; иммуноферментный анализ.

Для цитирования: Кузнецова Д.А., Лапин С.В., Гайдукова И.З., Ребров А.П., Маслянский А.Л. Клинико-диагностическая значимость аутоантител к CD74 при аксиальных спондилоартритах. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 68 (5): 297-301. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-297-301>

Kuznetsova D.A.¹, Lapin S.V.¹, Gaydukova I.Z.², Rebrov A.P.³, Maslyansky A.L.⁴

THE CLINICAL DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF AUTO ANTIBODIES TO CD74 AT AXIAL SPONDYLARTHROSIS

¹The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Pavlov First Saint Petersburg State Medical University" of Minzdrav of Russia, 197022, St. Petersburg, Russia

²The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "I.I. Mechnikov North-Western State medical University of Minzdrav of Russia, 191015, St. Petersburg, Russia

³The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The V.I. Razumovsky Saratov State Medical University" of Minzdrav of Russia, 410012, Saratov, Russia

⁴The Federal State Budget Educational Institution "The V.A. Almazov Federal Medical Research Center of Minzdrav of Russia, 197341, St. Petersburg, Russia

The modern diagnostic approaches permit to diagnose axial spondylarthrosis (axSpA) at roentgenologic stage corresponding to ankylosing spondylitis (AS). While early diagnostic of non-roentgenologic axSpA (nr-axSpA) is still complicated. This situation conditions a need in searching new laboratory biomarkers for early diagnostic of spondylarthrosis, including auto-antibodies to antigen CD74 described recently. The purpose of study is to evaluate clinical diagnostic significance of auto-antibodies to antigen CD74 in case of axSpA. The technique of quantitative enzyme-linked immunosorbent assay was applied to measure content of auto-antibodies IgA to CD74 in samples of serum from 140 patients with axSpA: 68 with AS, 46 with nr-axSpA, 26 with psoriatic arthritis (PA) and 37 healthy representatives of control group with signs of axSpA totally clinically excluded. The average values of concentration of auto-antibodies IgA to CD74 in patients with axSpA and nr-axSpA made up to $3,5 \pm 3,0$ and $3,8 \pm 2,9$ U/ml correspondingly that reliably and significantly differed from patients with PA and healthy individuals - $2,1 \pm 1,4$ and $1,3 \pm 1,4$ U/ml correspondingly ($p < 0,05$). At threshold value of content of auto-antibodies IgA to CD74 higher than 2.0 U/ml in case of axSpA diagnostic sensitivity made up to 64.4%, specificity - 89.2%, risk factor of positive result - 5.9 whereas in patients with nr-axSpA at concentration 1.7 U/ml - 73,1%, 84% and 4,5 correspondingly. The auto-antibodies IgA to antigen CD74 are associated with axSpA but not with PA that permits to use the given marker for diagnostic of axial spondylarthrosis and also in case of differential diagnostic between axSpA and PA.

Для корреспонденции: Кузнецова Дарья Александровна, врач клин. лаб. диагностики лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний НИИЦ по молекулярной медицине; e-mail: lariwar@mail.ru

К e y w o r d s : *axial spondylarthritis; ankylosing spondylitis; antibodies IgA to antigen CD74; enzyme-linked immunosorbent assay.*

For citation: *Kuznetsova D.A., Lapin S.V., Gaydukova I.Z., Rebrov A.P., Maslyansky A.L. The clinical diagnostic significance of auto antibodies to CD74 at axial spondylarthritis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2018; 63(5): 297-301. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-297-301>*

For correspondence: *Kuznetsova D.A., physician of clinical laboratory diagnostic of the laboratory of diagnostic of autoimmune diseases of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Pavlov First Saint Petersburg State Medical University", e-mail: lariwar@mail.ru*

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 16.01.2018
Accepted 29.02.2018

Спондилоартриты (СпА) (регистрационная категория по МКБ-10 – М46.8) представляют собой группу хронических, иммуноопосредованных воспалительных заболеваний позвоночника, суставов, энтезисов, характеризующихся общими клиническими, рентгенологическими и генетическими особенностями [1]. К СпА относят такие заболевания, как анкилозирующий спондилит (АС), или болезнь Бехтерева, нерентгенологический аксиальный спондилоартрит (нр-аксСпА), псориазический артрит (ПсА), реактивные артриты, артриты, ассоциированные с воспалительными заболеваниями кишечника, и недифференцированный СпА [2, 3]. При этом различают СпА с преимущественно периферическим (перСпА) и аксиальным вовлечением (аксСпА). Длительное малосимптомное течение и многообразие клинических симптомов аксСпА часто приводят к поздней постановке диагноза – в среднем через 8–10 лет после появления первых симптомов – и как следствие к позднему назначению патогенетически обоснованной терапии [4]. Традиционные диагностические подходы с использованием лучевых и лабораторных методов часто являются недостаточно объективными и информативными в ранних стадиях АС, не позволяя при этом проводить дифференциальную диагностику заболевания, а также оценку эффективности терапевтических мероприятий [4–6]. Вместе с тем современные генно-инженерные биологические препараты и малые молекулы показывают различную активность в зависимости от варианта СпА, поэтому корректное установление нозологической формы СпА представляется важным для эффективного лечения пациента [7].

Важнейшим иммунологическим биомаркером в лабораторной диагностике аксСпА является ген *HLA-B27*, выявление которого ассоциировано с высоким риском развития аксСпА, его тяжелым клиническим течением, прогрессированием нерентгенологической стадии в рентгенологическую и эффективным ответом на биологическую терапию [8]. Однако низкая диагностическая специфичность, а также значимая межпопуляционная гетерогенность встречаемости, диагностическая и прогностическая значимость гена *HLA-B27* не позволяют использовать его для подтверждения диагноза аксСпА [8–11].

Наряду с генетическими факторами, ассоциированными с акс-СпА, продемонстрирована диагностическая и прогностическая значимость различных серологических маркеров, в частности антител к различным микробным агентам (*Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycobacterium* и др.). Однако установлено, что данные антитела отмечались и

при других СпА, ревматоидном артрите и воспалительных заболеваниях кишечника [4, 12–14].

Кроме того, в последние годы была показана роль различных аутоантител, ассоциированных с риском развития, особенностями клинического течения и эффективностью терапии АС (аутоантитела к магнийзависимой протеинфосфатазе 1А (PPM1A), белку 14-3-3η), что в свою очередь ставит вопрос о наличии аутоиммунных этиопатогенетических факторах АС [4]. При этом аутоантитела к антигену CD74, впервые выявленные в 2014 г. N.T. Vaeglecken и соавт. [15], в настоящее время рассматриваются в качестве кандидатного биомаркера для диагностики аксСпА, в особенности нр-аксСпА. Биологическая функция CD74, также известного как антиген γ-цепи (инвариантной цепи) человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA class II γ-chain), состоит в его важной роли в сборке структур второго класса главного комплекса гистосовместимости (MHC class II) и предотвращения преждевременного связывания пептидов с ним в фаголизосомах антигенпрезентирующих клеток [20]. Кроме того, CD74 выступает в роли бактериального и интерлейкинового рецептора, участвующего в механизмах врожденного и адаптивного иммунитета, поддержании хронического воспаления, а также вовлечён во многие внутриклеточные сигнальные пути. Внеклеточная часть антигена CD74 состоит из тиреоглобулина I типа и класс II-ассоциированного пептида инвариантной цепи (class II-associated invariant chain peptide, CLIP). Аутоантитела IgG к антигену CD74 при АС обладают высокой аффинностью к внеклеточному домену CLIP, что приводит к активации клеточных мишеней (NF-κB, стимуляция S-фазы клеточного цикла, повышение экспрессии антиапоптоического белка Bcl-X_l) и производству большого количества провоспалительных цитокинов [4, 21].

Цель нашего исследования – оценить клинико-диагностическую значимость выявления аутоантител (IgA) к антигену CD74 при аксСпА.

Материал и методы. В исследование было включено 140 пациентов с аксСпА, которые были госпитализированы в ревматологическое отделение Областной клинической больницы (Саратов) в период 2013–2017 гг. и участвовали в проспективном когортном одноцентровом исследовании «ПРОГРЕСС» (ПРОГрамма монитоРинга активности и функционального статуса пациентов со Спондилоартритами в Саратовской области; регистрация на сайте www.citis.ru, № 01201376830 от 09.12.2013). Все пациенты отвечали критериям ASAS для аксСпА (2009). Основную группу составили 68 пациентов с АС, у которых диагноз установлен на основании модифицированных Нью-Йоркских критериев АС (1984). Кроме того, бы-

Диагностические параметры выявления аутоантител IgA к антигену CD74 у пациентов с аксСпА

Пациенты	AUC (95% ДИ)	ДЧ, %	ДС, %	ФР	Референсные значения, Ед/мл	<i>p</i>
АксСпА	0,74 (0,67–0,82)	64,4	89,2	5,9	2,0	< 0,0001
АС	0,68 (0,59–0,79)	60,3	89,2	5,6	2,0	0,001
нр-аксСпА	0,78 (0,58–0,83)	73,1	84,0	4,5	1,73	< 0,0001
ПсА	0,7 (0,69–0,89)	96,1	45,9	1,8	0,7	0,005

ли обследованы 46 пациентов с нр-аксСпА и 26 – с псориатическим артритом (ПсА), диагнозы которых были установлены в соответствии с критериями ASAS для аксСпА при отсутствии достоверного сакроилеита согласно описанию Kellgren с комментариями Bennet (1966) и классификации CASPAR (2006) соответственно [17–19]. Контрольная группа была представлена 37 здоровыми лицами, у которых на момент исследования клинически полностью отсутствовали указанные критерии СпА.

Для измерения содержания аутоантител (IgA) к антигену CD74 в полученных образцах сывороток пациентов применялся количественный иммуноферментный метод с использованием реагентов AESKULISA® SpAdetect («AESKU», Германия) согласно прилагаемой к набору инструкции.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с применением пакетов программ MS Excel (2016) и GraphPad 7.0. Для анализа данных, не удовлетворяющих нормальному распределению, а также количественных значений использовали критерии Манна – Уитни, для сравнения качественных значений – критерий χ^2 с соответствующими поправками. Для определения предсказательной ценности положительного результата теста рассчитывался фактор риска (ФР) положительного результата, который представляет собой частное от деления диагностической чувствительности (ДЧ) на единицу минус диагностическая специфичность (ДС).

Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России.

Результаты. Измерение содержания аутоантител IgA к антигену CD74 было проведено у 114 пациентов с аксСпА (включая пациентов с нр-аксСпА и АС), 26 пациентов с ПсА и 37 здоровых лиц.

Установлено, что среднее значение концентрации аутоантител IgA к CD74 в группе пациентов с аксСпА составило $3,5 \pm 3,0$ Ед/мл по сравнению с аналогичным показателем у пациентов с ПсА – $2,1 \pm 1,4$ Ед/мл ($p < 0,05$) и контрольной группой – $1,3 \pm 1,4$ Ед/мл ($p < 0,05$). При этом достоверно значимые различия в содержании аутоантител к CD74 у пациентов с ПсА по сравнению с контрольной группой отсутствовали (рис. 1, а).

Нами было показано, что среднее содержание аутоантител IgA к CD74 как среди пациентов с АС, так и среди пациентов с нр-аксСпА было достоверно значимо выше по сравнению с показателями в контрольной группе – $3,1 \pm 3,0$, $3,8 \pm 2,9$ и $1,3 \pm 1,4$ Ед/мл соответственно (рис. 1, б).

Для оценки диагностических параметров выявления аутоантител IgA

к антигену CD74 у пациентов с аксСпА, нр-аксСпА и ПсА проведен ROC-анализ. Установлено, что максимальное значение площади AUC с 95% доверительным интервалом (ДИ) исследуемого теста зарегистрировано у пациентов с нр-аксСпА – 0,78 (95% ДИ 0,58–0,83) и у пациентов с аксСпА – 0,74 (95% ДИ 0,67–0,82), тогда как у пациентов с ПсА и в группе контроля оно было практически одинаковым – 0,68 (95% ДИ 0,59–0,79) и 0,7 (95% ДИ 0,69–0,89) соответственно (см. таблицу).

Показано, что при пороговом значении содержания аутоантител IgA к антигену CD74 более 2,0 Ед/мл в группе пациентов с аксСпА по сравнению с контрольной группой ДЧ теста составила 64,4%, ДС – 89,2%, тогда как у пациентов только с нр-аксСпА при концентрации 1,7 Ед/мл показатель ДЧ повышается до 73,1%, а ДС составляет 84% (рис. 2, а). При этом у пациентов с ПсА при содержании IgA 0,7 Ед/мл значение ДЧ составило 96,1%, а ДС – в 2 раза меньше (рис. 2, б).

При оценке прогностической ценности определения содержания IgA к антигену CD74 при аксСпА и нр-аксСпА было установлено, что при практически одинаковых референсных значениях концентрации аутоантител (2 Ед/мл) ФР положительного результата был значимо выше в группе пациентов с аксСпА и у пациентов с нр-аксСпА по сравнению с контролем – 5,9 ($p < 0,0001$) и 4,5 ($p < 0,0001$) соответственно, в то время как у пациентов с ПсА данный показатель был существенно ниже – 1,8 ($p < 0,005$).

Обсуждение. Диагностика и дифференциальная диагностика аксСпА представляет собой сложную задачу современной ревматологии [4, 12]. Многообразие, большая продолжительность и субклинический характер течения аксСпА, недостаточная эффективность традиционных инструментально-лабораторных методов диагностики в ранних стадиях заболевания определяют потребность в поиске новых диагностических биомаркёров, позволяющих проводить оценку риска развития, прогноза клинического течения

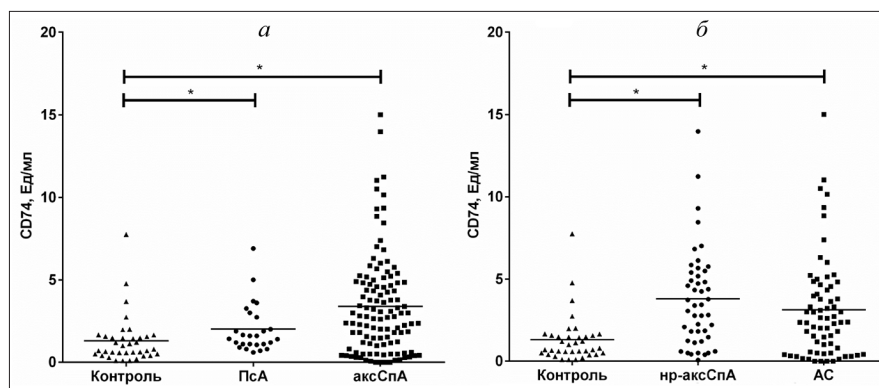


Рис. 1. Содержание аутоантител IgA к антигену CD74 (в Ед/мл) в группе пациентов с аксСпА, ПсА (а) и пациентов с нр-аксСпА и АС (б) в сравнении с контрольной группой. Достоверность различия средних $p < 0,05$.

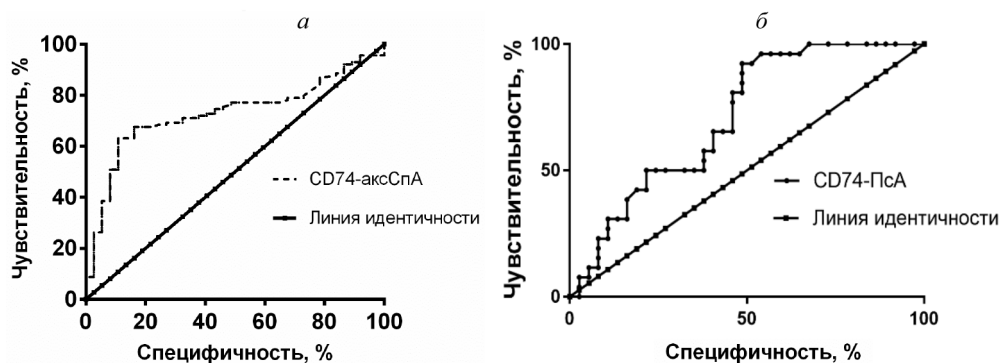


Рис. 2. ROC-кривые показателей содержания аутоантител IgA к антигену CD74 в группе пациентов с аксСпА (а) и у пациентов с ПсА (б).

и эффективности терапии аксСпА [22]. По мнению зарубежных исследователей, наибольшей клинико-диагностической значимостью при АС обладают аутоантитела к антигену CD74 [4, 15, 16, 21, 22].

Нами было показано, что концентрация аутоантител IgA к антигену CD74 была достоверно значимо (в 2,7 и 1,7 раза) выше у больных аксСпА по сравнению со здоровыми лицами и пациентами с ПсА соответственно и существенно не различалась у здоровых лиц и пациентов с ПсА ($2,1 \pm 1,4$ и $1,3 \pm 1,4$ Ед/мл соответственно; $p \geq 0,05$). Наряду с этим было обнаружено, что у пациентов с нр-аксСпА содержание аутоантител к CD74 было в 1,3 раза выше по сравнению с пациентами с АС и в 3 раза выше по сравнению со здоровыми лицами. Диагностическая ценность определения содержания аутоантител к CD74 у пациентов с ПсА отсутствовала.

Полученные нами результаты сопоставимы с данными зарубежных исследователей, показавших высокую чувствительность и специфичность IgG к CD74 у больных с аксСпА, что подтверждает клинико-патогенетическую и диагностическую значимость аутоантител к антигену CD74 при АС, в особенности при нр-аксСпА. Это, в свою очередь, позволяет пересмотреть традиционные взгляды на механизмы развития аксСпА – группы заболеваний, которые ранее в связи с отсутствием специфических аутоантител совокупно назывались «серонегативными спондилоартропатиями» в отличие от ревматоидного артрита, характеризующегося широким спектром серологических показателей [13, 14]. Кроме того, отсутствие аутоантител при аксСпА позволяло предполагать «аутовоспалительный характер» СпА, выделяя их среди других аутоиммунных заболеваний [7].

При проведении ROC-анализа мы установили, что наибольшей диагностической ценностью аутоантитела IgA к антигену CD74 обладают у пациентов с нр-аксСпА и АС по сравнению со здоровыми лицами, что позволяет использовать выявление данных аутоантител для диагностики АС, включая его нерентгенологические формы. При этом диагностическая значимость аутоантител IgA к CD74 для ПсА была менее значимой, что делает возможным определение данного биомаркера при проведении дифференциальной диагностики некоторых видов СпА.

Заключение. Аутоантитела IgA к антигену CD74 обладают клинико-патогенетической и диагностической значимостью при АС и нр-СпА, но не ассоциированы с риском развития ПсА. Определение содержания аутоантител IgA к антигену CD74 в совокупности с традиционными диагностическими подходами позволяет

использовать данный маркер в клинической практике для ранней и дифференциальной диагностики различных вариантов СпА, а также служит предпосылкой для разработки новых подходов к фармакотерапии данной группы заболеваний.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2 – 11, 15 – 22
см. REFERENCES)

1. Эрдес Ш.Ф., Бадокин В.В., Бочкова А.Г., Бугрова О.В., Гайдукова И.З., Годзенко А.А. и др. О терминологии спондилоартритов. *Научно-практическая ревматология*. 2015; 53(6): 657-60.
12. Александрова Е.Н., Новиков А.А. Лабораторные биомаркеры анкилозирующего спондилита. *Научно-практическая ревматология*. 2017; (55)1: 96-103.
13. Маслянский А.Л., Лапин С.В., Иливанова Е.Л., Мазуров В.И., Тотолян А.А. Антикератиновые антитела и антиперинуклеарный фактор являются маркером агрессивного течения ревматоидного артрита. *Медицинская иммунология*. 2003; 5(5-6): 599-608.
14. Лапин С.В., Маслянский А.Л., Иливанова Е.Л., Мазуров В.И., Тотолян А.А. Клиническое значение антител к циклическому цитрулинированному пептиду при раннем ревматоидном артрите. *Медицинская иммунология*. 2004; 6(1-2): 57-66.

REFERENCES

1. Erdes Sh.F., Badokin V.V., Bochkova A.G., Bugrova O.V., Gaydukova I.Z., Godzenko A. A. et al. On the terminology of spondyloarthritis. *Nauchno-prakticheskaya Revmatologiya*. 2015; 53(6):657-660. (in Russian)
2. El. Maghraoui A. Extra-articular manifestations of ankylosing spondylitis: prevalence, characteristics and therapeutic implications. *Eur. J. Intern Med*. 2011; 22(6): 554-60.
3. Ward M.M., Deodhar A., Akl E.A., Lui A., Ermann J., Gensler L.S. et al. American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network 2015 Recommendations for the Treatment of Ankylosing Spondylitis and Nonradiographic Axial Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2016; 68(2): 282-298.
4. Quaden D.H., De Winter L.M., Somers V. Detection of novel diagnostic antibodies in ankylosing spondylitis: An overview. *Autoimmun Rev*. 2016; 15(8): 820-832.
5. Feldtkeller E., Khan M.A., van der Heijde D., van der Linden S., Braun J. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol.Int*. 2003; 23(2): 61-66.
6. Maksymowych W.P. An update on biomarker discovery and use in axial spondyloarthritis. *Expert Rev. Mol. Diagn*. 2017; 17(11): 965-74.

7. Taurog J.D., Chhabra A., Colbert R.A. Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(26): 2563-74.
8. Rudwaleit M., Landewé R., van der Heijde D., Listing J., Brandt J., Braun J. et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann. Rheum. Dis.* 2009; 68(6): 770-6.
9. Costantino F., Talpin A., Said-Nahal R., Goldberg M., Henny J., Chiochia G. et al. Prevalence of spondyloarthritis in reference to HLA-B27 in the French population: results of the GAZEL cohort. *Ann. Rheum. Dis.* 2015; 74(4): 689-93.
10. Otsuka A., Morita M., Yamada H. Clinical characteristics of Japanese patients with axial spondyloarthritis, and short-term efficacy of adalimumab. *J. Orthop. Sci.* 2015; 20(6): 1070-7.
11. Omair M.A., AlDuraibi F.K., Bedaiwi M.K., Abdulaziz S., Husain W., El Dessougi M. et al. Prevalence of HLA-B27 in the general population and in patients with axial spondyloarthritis in Saudi Arabia. *Clin. Rheumatol.* 2017; 36(7): 1537-43.
12. Aleksandrova E.N., Novikov A.A. Laboratornye biomarkery ankirozirujushhego spondilita. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2017; (55)1: 96-103. (in Russian)
13. Masljanskij A.L., Lapin S.V., Ilivanova E.L., Mazurov V.I., Totoljan A.A. Antikeratinovye antitela i antiperinuklearnyj faktor javljajutsja markerom aggressivnogo techenija revmatoidnogo artrita. *Meditsinskaya immunologiya.* 2003; 5(5-6): 599-608. (in Russian)
14. Lapin S.V., Masljanskij A.L., Ilivanova E.L., Mazurov V.I., Totoljan A.A. Klinicheskoe znachenie antitel k ciklicheskomu citrullinirovanomu peptidu pri rannem revmatoidnom artrite. *Meditsinskaya immunologiya.* 2004; 6(1-2): 57-66. (in Russian)
15. Baerlecken N.T., Nothdorft S., Stummvoll G.H., Sieper J., Rudwaleit M., Reuter S. et al. Autoantibodies against CD74 in spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73(6): 1211-4.
16. Baraliakos X., Baerlecken N., Witte T., Heldmann F., Braun J. High prevalence of anti-CD74 antibodies specific for the HLA class II-associated invariant chain peptide (CLIP) in patients with axial spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73(6): 1079-82.
17. Van der Linden S., Valkenburg H.A., Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 1984; 27 (4): 361-8.
18. Taylor W., Gladman D., Helliwell P., Marchesoni A., Mease P., Mielants H. et al. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum.* 2006; 54 (8): 2665-73.
19. Rudwaleit M., van der Heijde D., Landewé R., Akkoc N., Brandt J., Chou C.T. et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for axial spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann. Rheum. Dis.* 2009; 70(1): 25-31.
20. Beswick E.J., Reyes V.E. CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15(23): 2855-61.
21. Prajzlerová K., Grobelná K., Pavelka K., Šenolt L., Filková M. An update on biomarkers in axial spondyloarthritis. *Autoimmun. Rev.* 2016; 15(6): 501-9.
22. Baerlecken N. T., Witte T. Methods and means for diagnosing spondyloarthritis using autoantibody markers. *Patent EP, № 2420834A1*; 2010.

Поступила 16.01.18
Принята к печати 23.01.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.24-002.5-07:616.155.1

Рясенский Д.С., Асеев А.В., Эльгали А.И.

СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЛЁГКИХ

ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 170100, Тверь, Россия

Обследовано 308 больных лекарственно-чувствительным (или с отсутствием сведений об устойчивости) туберкулёзом лёгких без распада лёгочной ткани с целью определения особенностей изменения состава и структурной организации моноцитарных мембран до лечения, а также на фоне приёма химиотерапевтических препаратов по 1 стандартному режиму. Были использованы данные клинико-рентгенологического обследования больных, бактериоскопии, молекулярно-генетического исследования, а также исследования фосфолипидного спектра мембран мононуклеаров периферической крови. Для определения отдельных классов фосфолипидов использовали тонкослойную проточную хроматографию. Определяли следующие фракции фосфолипидов: суммарные лизофосфолипиды, сфингомиелин, фосфатидилинозитол, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин. Для оценки структурно функционального состояния мононуклеаров периферической крови при туберкулёзе нами были использованы коэффициенты активности фосфолипаз и проницаемости мембран. Выявлено, что при туберкулёзной инфекции наблюдается изменение функциональной активности и перестройка мембран мононуклеаров периферической крови, выражающаяся в повышении процентного содержания фосфатидилинозитола и фосфатидилэтаноламина и снижении уровня сфингомиелина, фосфатидилхолина и фосфатидилсерина. У больных туберкулёзом до лечения наблюдается снижение коэффициента проницаемости мембран, а после проведения химиотерапии коэффициент проницаемости возвращается к норме. Противотуберкулёзная химиотерапия вызывает активацию фосфолипазы A2, что оказывает мембранодеструктивное воздействие на мононуклеары периферической крови и ведёт к дезорганизации их мембран, выражающейся в накоплении лизофосфолипидов при одновременном снижении процентного содержания фосфатидилсерина и фосфатидилхолина. Токсический эффект противотуберкулёзной химиотерапии не отражается на количестве моноцитов периферической крови, при этом происходит дезорганизация мембранных структур этих клеток и, вероятно, угнетение их функциональной активности.

Ключевые слова: туберкулез; фосфолипиды; мононуклеары; клеточный иммунитет; противотуберкулёзная химиотерапия.

Для цитирования: Рясенский Д.С., Асеев А.В., Эльгали А.И. Состояние мембран мононуклеарных лейкоцитов у больных туберкулезом легких. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (5): 301-305. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-301-305>.

Ryasensky D.S., Aseev A.V., Elgali A.I.

THE STATE OF MEMBRANES OF MONONUCLEAR LEUKOCYTES IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS OF LUNGS

The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Tver State Medical University" of Minzdrav of Russia, 170100, Tver, Russia

The sampling of examined patients comprised 308 individuals with medication sensitive (or with absence of data about resistance) tuberculosis of lungs without decay of pulmonary tissue with purpose to detect characteristics of alteration of content and structural organization of monocytic membranes before treatment and also against the background of application of chemotherapy according 1 standard regimen. The data of clinical radiologic examination of patients, bacterioscopy, molecular genetic analysis and analysis of phospholipid spectrum of membranes of mononuclears of peripheral blood were used. To detect particular classes of phospholipids the thin-layer flow chromatography was applied. The following fractions of phospholipids were detected: aggregated lysophospholipids, sphingomyelin, phosphatidylinositol, phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine. To evaluate structurally functional condition of mononuclears of peripheral blood under tuberculosis the coefficients of activity of phospholipase and membrane permeability were applied. It is established that in case of tuberculosis infection an alteration of functional activity and restructuring of membranes of mononuclears of peripheral blood is observed expressed by increasing of content percentage of phosphatidylinositol and phosphatidylethanolamine and in decreasing of level of sphingomyelin, phosphatidylcholine and phosphatidylserine. In patients with tuberculosis prior to treatment decreasing of coefficient of membrane permeability. After application of chemotherapy coefficient of membrane permeability returned to standard. The anti-tuberculosis chemotherapy gives rise to activation of phospholipase A2 that shows membrane destructive effect on mononuclears of peripheral blood and results in disorganization of their membranes manifesting in cumulation of lysophospholipids at simultaneous decreasing of percentage content of phosphatidylserine and phosphatidylcholine. The toxic effect of anti-tuberculosis chemotherapy has no effect on number of monocytes in peripheral blood. At that, disorganization of membrane structures of these cells and possible suppression of their functional activity occur.

Key words: tuberculosis; phospholipids; cellular immunity; mononuclears; anti-tuberculosis chemotherapy.

For citation: Ryasensky D.S., Aseev A.V., Elgali A.I. The state of membranes of mononuclear leukocytes in patients with tuberculosis of lungs. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(5): 301-305. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-301-305>.

For correspondence: Ryasensky D.S., candidate of medical sciences, associate professor of the chair of phthisiology of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Tver State Medical University", e-mail: meddim3@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 22.01.2018
Accepted 25.01.2018

Введение. Туберкулёз – это длительно протекающее инфекционное заболевание, требующее комплексного подхода к его лечению с использованием не только этиотропной терапии, но и различных методов патогенетической коррекции возникающих в процессе лечения патологических состояний. Многочисленными исследованиями установлено, что туберкулёз протекает на фоне различных нарушений иммунитета, в особенности клеточного [1–5]. До XX века прошлого тысячелетия не существовало эффективных методов борьбы с этой болезнью, так как не были открыты химиотерапевтические препараты, способные угнетать развитие микобактерий в организме человека. Появление этиотропной химиотерапии туберкулёза открыло новые перспективы развития лечения данного заболевания [6]. Однако наряду с высокой эффективностью химиотерапия даёт ряд токсичных эффектов. Согласно данным отечественных исследований, почти у 90% больных туберкулёзом лёгких регистрируется развитие как минимум одной нежелательной побочной реакции. Наличие побочных эффектов, требующих изменения схемы специфической терапии или её временной отмены, по различным данным, регистрируется у 60–80% впервые выявленных больных, получающих химиотерапию [7, 8]. Хорошо изучено влияние противотуберкулёзных химиотерапевтических препаратов на нервную систему, печень, почки [9–11]. Особый интерес представляет изучение действия противотуберкулёзных препаратов на клеточное звено

иммунного ответа. В литературе встречаются отдельные работы, посвящённые изучению иммунного ответа в условиях применения противотуберкулёзных препаратов [12, 13]. Для улучшения показателей этиотропной терапии необходимо основываться на патогенетических механизмах иммунного ответа при туберкулёзе. Однако в основе эффективной деятельности клеточных реакций лежит структурная целостность иммунцитов, важнейшим компонентом которой является структурная организация клеточных мембран. Среди общих проявлений побочного действия противотуберкулёзных препаратов ведущим и, вероятнее всего, первоначальным является изменение внутриклеточного метаболизма и нарушение структуры и функции плазматической мембраны иммунокомпетентных клеток [14].

Изучение цитохимических особенностей липидного бислоя мононуклеаров позволит выявить закономерности структурно-функциональных нарушений у больных туберкулёзом лёгких, развивающихся под влиянием казеозного воспаления и противотуберкулёзных химиопрепаратов.

Целью настоящего исследования явилось изучение соотношений липидных компонентов мембран мононуклеаров периферической крови у больных туберкулёзом лёгких до лечения и на фоне приёма химиотерапевтических препаратов.

Материал и методы. Нами было обследовано 308 больных туберкулёзом лёгких, находившихся на ста-

ционарном лечении в Тверском областном клиническом противотуберкулёзном диспансере с 2012 по 2016 г. Все обследованные относились к группе лиц молодого и среднего возраста (от 25 до 60 лет) по классификации, предложенной ВОЗ. В исследование вошли больные обоих полов в равном соотношении в соответствии с критериями включения-исключения. Критерии включения: добровольное информированное согласие, очаговый или инфильтративный туберкулёз лёгких без распада. Критерии исключения: отказ от продолжения лечения, выявление сопутствующей патологии (ВИЧ, вирусные гепатиты, психические заболевания), появление распада, выявление множественной лекарственной устойчивости или индивидуальной непереносимости препаратов 1-го ряда.

Контрольную группу (группа 1) составили 36 здоровых добровольцев в возрасте от 24 до 58 лет, обоих полов в равном соотношении. Без диагностированной сопутствующей соматической и инфекционной патологии.

Вторую группу (группа 2) составили больные туберкулёзом лёгких до начала проведения химиотерапии. В третью группу (группа 3) вошли больные после окончания интенсивной фазы противотуберкулёзной химиотерапии по 1 стандартному режиму.

Диагноз туберкулёза и сведения о лекарственной чувствительности подтверждены рентгенологическими, микробиологическими и молекулярно-генетическими методами. Обследование выполняли на базе Тверского областного противотуберкулёзного диспансера. Определение липидного спектра и его анализ проводили на базе Тверского государственного университета.

Кровь для исследования забирали из периферической вены утром натощак в пробирки с антикоагулянтом. Далее клеточные элементы разделяли на градиенте плотности фиколл-верографин с последующей трехкратной отмывкой физиологическим раствором. Чистоту полученного материала определяли микроскопически. Экстракцию липидов производили по Фолчу. В качестве экстрагирующей смеси использовали смесь хлороформа и метанола в соотношении 1:2, это позволяло добиться наиболее полной экстракции минорных фракций фосфолипидов [15]. Концентрации липидного экстракта добивались выпариванием под вакуумом при температуре 10°C. Это позволяло избежать нежелательного окисления экстракта, а также свести к минимуму реакции взаимопревращения липидов *in vitro*. Для разделения полученной смеси на отдельные классы фосфолипидов использовали одномерную тонкос-

лойную проточную хроматографию. В качестве элюирующей смеси использовали систему растворителей, состоящую из хлороформа, метанола и аммиака в соотношении 13,4:4,6:1. Идентификацию фракций проводили по свидетелям и цветным качественным реакциям. Оценку относительного содержания отдельных фракций липидного спектра выполняли в отражённом свете после обугливания хроматограмм в парах серной кислоты [15, 16]. Для обработки полученных спектров использовали программный комплекс «Хромоскан», позволяющий рассчитывать площадь даже не полностью разделённых пиков за счёт аппроксимации. Определяли следующие фракции фосфолипидов: суммарные лизофосфолипиды (ЛФЛ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилэтаноламин (ФЭ) [16]. Расчёт проводили в процентах к сумме идентифицируемых фракций. Статистическую обработку выполняли в программе «Статистика 10» с применением стандартных статистических методов [17]. Для расчёта коэффициентов и значимости их статистических различий использовали Excel 2016.

Результаты и обсуждение. При анализе полученных данных выявили незначительные различия лейкоцитарной формулы у больных туберкулёзом лёгких до начала лечения и в конце интенсивной фазы противотуберкулёзной химиотерапии. У обследованных больных в группах 1 и 2 наблюдался умеренный лейкоцитоз с моноцитопенией. Наблюдаемые нами изменения не противоречат данным литературы и характерны для больных туберкулёзом лёгких без распада лёгочной ткани. Такие показатели белой крови отражают особенности адаптации организма к инфекционному процессу и перераспределение лейкоцитарных клеток с выходом клеточных элементов к очагу туберкулёзного воспаления. Наибольший интерес представляет изучение структурно-функциональной перестройки мононуклеаров и мембранодеструктивного эффекта противотуберкулёзных препаратов, проявляющегося изменением соотношений отдельных фосфолипидных компонентов биологических мембран иммунокомпетентных клеток. Проведённое исследование показало значительные изменения в строении билипидного слоя моноцитов периферической крови (табл. 1).

До назначения противотуберкулёзной химиотерапии больным туберкулёзом уровень ЛФЛ достоверно не отличался от такового у здоровых людей, однако после проведения интенсивной фазы по 1 стандартному режиму его значения увеличились в 1,6 раза и оказались

достоверно выше по сравнению с аналогичным показателем у здоровых и больных туберкулёзом до начала лечения ($p < 0,01$). Уровень СМ наоборот снижался у больных туберкулёзом как до начала химиотерапии, так и после завершения интенсивной фазы. При этом различия по данному критерию между группами 2 и 3 оказались недостоверны ($p > 0,05$). Относительное содержание в клеточных мембранах ФИ у больных туберкулёзом в группах 2 и 3 было более чем в 2 раза выше соответствующего показателя в контрольной группе ($p < 0,01$).

Таблица 1

Фосфолипиды мембран моноцитов

Группа	Фракции фосфолипидов, $M \pm m$					
	ЛФЛ	СМ	ФИ	ФХ	ФС	ФЭ
Группа 1	7,1±0,3	18,6±0,6	5,3±0,3	43,4±0,8	5,1±0,3	20,5±0,5
Группа 2	6,8±0,2	14,9±0,4	10,9±0,1	38,9±0,5	2,4±0,2	26,1±0,4
Группа 3	11,4±0,1	14,7±0,3	10,6±0,2	33,6±0,5	3,6±0,2	26,0±0,4
p_1	> 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
p_2	< 0,01	> 0,05	> 0,05	< 0,01	< 0,01	> 0,05
p_3	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Примечание. Здесь и в табл. 2: p_1 – достоверность различий показателей фосфолипидов группы 1 по отношению к группе 2; p_2 – достоверность различий показателей фосфолипидов группы 2 по отношению к группе 3; p_3 – достоверность различий показателей фосфолипидов группы 1 по отношению к группе.

Таблица 2

Значения отношений фосфатидилхолина к лизофосфолипидам, сфингомиелина к фосфатидилхолину

Группа	Коэффициенты	
	ФХ/ЛФЛ Коэффициент активности фосфолипаз	СМ/ФХ Коэффициент проницае- мости мембран
Группа 1	6,11 ± 0,3	0,43 ± 0,1
Группа 2	5,72 ± 0,2	0,38 ± 0,1
Группа 3	2,94 ± 0,1	0,43 ± 0,1
p_1	< 0,01	< 0,05
p_2	< 0,01	< 0,05
p_3	< 0,01	> 0,05

Однако различие по данной фракции фосфолипидов между больными до начала противотуберкулёзной терапии и в конце интенсивной фазы статистически недостоверно ($p > 0,05$). Уровень ФХ у больных туберкулёзом снижался по сравнению с таковым у здоровых людей. При этом снижение относительного содержания ФХ было более выражено у больных после приема химиотерапевтических препаратов. Значения уровня ФС также были снижены у больных туберкулёзом в обеих группах, однако содержание данной фракции было достоверно выше у больных после интенсивной фазы химиотерапии ($p < 0,01$). Относительное содержание ФЭ у больных туберкулёзом напротив повышается. Значение данной фракции не изменяется на фоне применения противотуберкулёзной химиотерапии. Различия по данной фракции в группах 2 и 3 оказались недостоверными ($p > 0,05$).

Для оценки состояния мононуклеаров периферической крови при туберкулёзе нами были использованы коэффициенты активности фосфолипаз и проницаемости мембран (табл. 2).

Отношение процентного содержания фракции фосфатидилхолина к фракции лизофосфолипидов (ФХ/ЛФЛ) показывает степень повреждения клетки вследствие накопления в её мембране токсичных фосфолипидов и отражает активность фосфолипазы А2. Полученные нами данные свидетельствуют о небольшом повышении активности фосфолипазы А2 у больных туберкулёзом до проведения химиотерапии, что является отражением реакции организма на туберкулёзную инфекцию. После окончания интенсивной фазы химиотерапии нами выявлено резкое снижение коэффициента, которое свидетельствует о значительной активации фосфолипазы А2 и как следствие о накоплении токсичных фосфолипидов. Выявленные изменения говорят о снижении структурной устойчивости мононуклеаров, необходимой для обеспечения полноценного иммунного ответа. Эти изменения существовали до начала лечения и усугублялись вследствие мембранодеструктивного эффекта противотуберкулёзной химиотерапии.

Для оценки состояния билипидного слоя мембран мононуклеаров использовали отношение сфингомиелина и фосфатидилхолина (СМ/ФХ). Данный коэффициент, называемый также коэффициентом проницаемости, показывает изменение липидной «жидкости» мембран. В результате проведённого исследования установлено, что у больных туберкулёзом до начала лечения данный коэффициент был достоверно ниже, чем у здоровых людей ($p < 0,05$), а после проведённого лечения

возвращался к контрольным значениям. Такое изменение проницаемости мембран моноцитов обусловлено адаптационными реакциями организма в ответ на казеозное воспаление. Считается, что после проведения интенсивной фазы химиотерапии происходит элиминация 90% микобактериальной флоры, поэтому значения данного коэффициента в группе 3 не отличались от таковых в группе контроля ($p > 0,05$).

Таким образом, нами были выявлены значительные изменения фосфолипидного состава мембран мононуклеаров у больных туберкулёзом до лечения и после проведения интенсивной фазы основного курса химиотерапии. Полученные данные характеризуют изменения структурно-функционального состояния мононуклеаров как следствие казеозного воспаления, так и в результате специфического воздействия противотуберкулёзной химиотерапии.

Выводы. У больных туберкулёзом лёгких до лечения наблюдается изменение соотношений основных классов фосфолипидов мембран мононуклеаров, которое выражается в повышении процентного содержания фосфатидилинозола и фосфатидилэтаноламина и снижении уровня сфингомиелина, фосфатидилхолина и фосфатидилсерина.

Противотуберкулёзная химиотерапия сопровождается активацией фосфолипазы А2, что оказывает мембранодеструктивное влияние на мононуклеары периферической крови и ведёт к дезорганизации их мембран. Дезорганизация мембран выражается в накоплении лизофосфолипидов при одновременном снижении процентного содержания фосфатидилсерина и фосфатидилхолина.

У больных туберкулёзом до лечения наблюдается снижение коэффициента проницаемости мембран, а после проведения химиотерапии коэффициент проницаемости возвращается к норме.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мордык А.В., Плеханова М.А., Пацула Ю.И., Жукупцева С.И., Солдатова И.А., Глинских О.С., Цыганков Е.А. Оценка специфического клеточного иммунитета у детей и подростков, больных туберкулёзом. *Вестник современной клинической медицины*. 2010; (4): 60–64.
2. Левашева Ю.Н., Репина Ю.М. Руководство по легочному и внелегочному туберкулёзу. СПб.: ЭЛБИ-СПб; 2008.
3. Кноринг Б.Е., Фрейдлин И.С., Симбирцев А.С. Характер специфического иммунного ответа и продукция цитокинов мононуклеарами крови больных разными формами туберкулёза лёгких. *Медицинская иммунология*. 2001; 3 (1): 61–8.
4. Тюлькова Т.Е., Чугаев Ю.П., Кашуба Э.А. Особенности функционирования иммунной системы при туберкулёзной инфекции. *Проблемы туберкулёза*. 2002; (11): 48–55.
5. Хасанова Р.Р., Воронкова О.В., Уразова О.И. Роль цитокинов в модуляции субпопуляционного состава лимфоцитов крови у больных туберкулёзом лёгких. *Проблемы туберкулёза и болезней лёгких*. 2008; (3): 31–5.
6. Мишин В.Ю. Современные режимы химиотерапии туберкулёза лёгких, вызванного лекарственно-чувствительными и лекарственно-резистентными микобактериями. *Русский медицинский журнал*. 2003; 11 (21): 1163–7.
7. Золотова Н.В., Баранова Г.В., Стрельцов В.В., Харитоновна

- Н.Ю., Ахтямова А.А., Багдасарян Т.Р. Особенности переносимости противотуберкулезной химиотерапии с учетом психологического статуса пациентов. *Туберкулез и болезни легких*. 2017; (5):7-15.
8. Иванова Д.А., Борисов С.Е., Рыжов А.М., Иванушкина Т.Н. Частота и риск развития тяжелых нежелательных реакций при лечении впервые выявленных больных туберкулезом. *Туберкулез и болезни легких*. 2012. (12):15-22.
9. Лысов А.В., Мордык А.В., Затворницкий В.А., Кондря А.В. О побочных нейротоксических реакциях при химиотерапии туберкулеза и их лечении. *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. 2006; (9): 45-8.
10. Меркулов С.А., Королева М.В. Применение таурина в лечении лекарственного поражения печени на фоне специфической терапии туберкулеза лёгких. *Врач-аспирант*. 2013; (4): 33-9.
11. Степанова Н.А., Стрельцова Е.Н., Галимзянов Х.М., Кантемирова Б.И. Нежелательные побочные реакции на противотуберкулезные препараты основного ряда. *Туберкулез и болезни легких*. 2016; (5): 42-5.
12. Серебрякова В.А., Васильева О.А., Уразова О.И., Новицкий В.В., Воронкова О.В., Стрелис А.К., Будкина Т.Е., Хасанова Р.Р., Наследникова И.О. Пролиферативный и секреторный ответ мононуклеарных лейкоцитов на комбинированное воздействие этамбутола и микобактериального антигена. *Медицинская иммунология*. 2009;11(2-3):153-60.
13. Чурина Е.Г., Новицкий В.В., Уразова О.И., Колосова А.Е., Воронкова О.В., Филинук О.В., Некрасов Е.В., Есимова И.Е., Хасанова Р.Р. Особенности иммунорегуляции у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких. *Медицинская иммунология*. 2011;13(2-3):267-72.
14. Есимова И.Е. *Состояние липидной фазы мембраны мононуклеарных клеток крови при туберкулезе легких*. Дис. ... канд. мед. наук. Томск; 2007.
15. Макаров В.К., Рясенский Д.С. Фосфолипиды сыворотки крови и мембран лимфоцитов при остром вирусном гепатите В и токсическом гепатите. *Биомедицинская химия*. 2009; (4): 525-9.
16. Макаров В.К., Рясенский Д.С. Влияние HBV-инфекции и суррогатов алкоголя на липидный состав мембран лимфоцитов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2009; (6): 43-5.
17. Елисеева И.И., Курьшева С.В., Егорова И.И. *Статистика*. М: Проспект; 2015.
4. Tyul'kova T.E., CHugaev YU.P., Kashuba E.H.A. Features of the functioning of the immune system in case of tuberculosis infection. *Problemy tuberkuleza*. 2002; (11): 48—55. (in Russian)
5. Hasanova R.R., Voronkova O.V., Urazova O.I. The role of cytokines in modulating the subpopulation composition of blood lymphocytes in patients with pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza I bolezney legkikh*. 2008; (3): 31—5. (in Russian)
6. Mishin V.Yu. Modern regimens of chemotherapy for pulmonary tuberculosis caused by drug-sensitive and drug-resistant mycobacteria. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2003; 11 (21): 1163-7. (in Russian)
7. Zolotova N.V., Baranova G.V., Strel'cov V.V., Haritonova N.YU., Ahtyamova A.A., Bagdasaryan T.R. Peculiarities of tolerability of antituberculous chemotherapy taking into account the psychological status of patients. *Tuberkulez I bolezni legkikh*. 2017; (5): 7-15. (in Russian)
8. Ivanova D.A., Borisov S.E., Ryzhov A.M., Ivanushkina T.N. The frequency and risk of developing severe adverse reactions in the treatment of newly diagnosed tuberculosis patients. *Tuberkulez I bolezni legkikh*. 2012; (12): 15-22. (in Russian)
9. Lysov A.V., Mordyk A.V., Zatvornickij V.A., Kondrya A.V. About adverse neurotoxic reactions at a chemotherapy of a tuberculosis and their treatment. *Problemy tuberkuleza I bolezny legkikh*. 2006; (9): 45-8. (in Russian)
10. Merkulov S.A., Koroleva M.V. The use of taurine in the treatment of drug damage to the liver against the background of specific therapy for pulmonary tuberculosis. *Vrach-aspirant*. 2013; (4): 33-9. (in Russian)
11. Stepanova N.A., Strel'cova E.N., Galimzyanov H.M., Kantemirova B.I. Unwanted adverse reactions to anti-tuberculosis drugs of the main series. *Tuberkulez I bolezni legkikh*. 2016; (5): 42-5. (in Russian)
12. Serebryakova V.A., Vasil'eva O.A., Urazova O.I., Novickij V.V., Voronkova O.V., Strelis A.K., Budkina T.E., Hasanova R.R., Naslednikova I.O. Proliferative and secretory response of mononuclear leukocytes to combined effects of ethambutol and mycobacterial antigen. *Meditsinskaya immunologiya*. 2009; 11(2-3): 153-60 (in Russian)
13. CHurina E.G., Novickij V.V., Urazova O.I., Kolosova A.E., Voronkova O.V., Filinyuk O.V., Nekrasov E.V., Esimova I.E., Hasanova R.R. Features of immunoregulation in patients with fibrous-cavernous pulmonary tuberculosis. *Meditsinskaya immunologiya*. 2011; 13(2-3): 267-72. (in Russian)
14. Esimova I.E. The state of the lipid phase of the membrane of mononuclear blood cells in pulmonary tuberculosis. Dis. Tomsk; 2007. (in Russian)
15. Makarov V.K., Riasenskii D.S. Phospholipids of blood serum and lymphocyte membranes for acute viral hepatitis B and toxic hepatitis. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2009; (4): 525-9. (in Russian)
16. Makarov V.K., Riasenskii D.S. Influence of HBV infection and alcohol substitutes on the lipid composition of lymphocyte membranes. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2009; (6): 43-5. (in Russian)
17. Eliseeva I.I., Kuryshcheva S.V., Egorova I.I. *Statistics [Statistika]*. Moscow: Prospekt; 2015. (in Russian)

Поступила 22.01.18

Принята к печати 25.01.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.348-006.04-033.2-078.33

Чеснокова Н.П.¹, Барсуков В.Ю.², Агабеков А.И.¹, Рзаева Т.Ш.¹

ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА КРОВИ И ГОРМОНАЛЬНОГО БАЛАНСА ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ВОСХОДЯЩЕГО ОТДЕЛА ОБОДОЧНОЙ КИШКИ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РАЗВИТИЯ ПРОЦЕССОВ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

¹ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ», 410012, Саратов, Россия;

²НУЗ «Дорожная клиническая больница на станции Саратов II» ОАО «РЖД», 410004, Саратов, Россия

В данной работе изучены характер нарушений клеточного состава периферической крови и иммунного статуса крови, их связь с гормональным дисбалансом. Проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование 60 пациентов с локальными (T1–2 N0M0) и местно-распространёнными (T3–4 (a, b) N0M0, T3–4 (a, b) N1–2M0) стадиями аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки, находившихся на лечении в клинике хирургии и онкологии на базе НУЗ «Дорожная клиническая больница на станции Саратов II» ОАО «РЖД» за период с 2012 по 2016 г. Диагноз верифицировали с помощью традиционных методов – колоноскопии с экспресс-цитологическим исследованием; распределение по группам наблюдений выполняли после оперативного лечения – правосторонней гемиколэктомии, по результатам планового патоморфологического исследования. Проведена сравнительная оценка клеточного состава периферической крови, субпопуляционного состава лимфоцитов, а также содержания в крови адренокортикотропного гормона (АКТГ), кортизола и соматотропного гормона (СТГ). Установлена патогенетическая взаимосвязь между прогрессирующим повышением в крови пациентов уровня кортизола, иммунодефицита по T-, а затем по B- системе лимфоцитов, возрастанием уровня СТГ и развитием локальных метастазов. Диагностическими критериями перехода локальной стадии аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки в местно-распространённую форму являются прогрессирующее увеличение содержания в крови кортизола, АКТГ, СТГ на фоне усиливающихся лимфопении, моноцитопении, T-зависимого иммунодефицита. Мониторинг показателей уровня лимфоцитов, моноцитов крови и их субпопуляционный состав, содержание в крови кортизола и СТГ могут быть использованы в качестве критериев распространения неоплазии при клинически неманифестирующих метастазах.

Ключевые слова: аденокарцинома ободочной кишки; иммунный статус; гормональный статус

Для цитирования: Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю., Агабеков А.И., Рзаева Т.Ш. Изменения клеточного состава крови и гормонального баланса при аденокарциноме восходящего отдела ободочной кишки как диагностические критерии развития процессов метастазирования. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (5): 306-309. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-306-309>

Chesnokova N.P.¹, Barsukov V.Yu.², Agabekov A.I.¹, Rzaeva T.Sh.¹

THE ALTERATIONS OF CELLULAR COMPOSITION OF BLOOD AND HORMONAL BALANCE UNDER ADENOCARCINOMA OF ASCENDING PART OF COLON AS DIAGNOSTIC CRITERIA OF DEVELOPMENT OF PROCESSES OF METASTASIS

¹The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The V.I. Razumovsky Saratov State Medical University" of Minzdrav of Russia, 410012, Saratov, Russia;

²The Non-State Institution of Health Care "The Road Clinical Hospital at the Station Saratov II" of The Public Corporation "Russian Railways", 410004, Saratov, Russia

The article presents the analysis of character of derangement of peripheral blood composition and blood immune status and their relationship with hormonal imbalance. The complex clinical laboratory examination was carried out covering 60 patients with local (T1-2 N0M0) and locally prevalent (T3-4 (a, b) N0M0, T3-4 (a, b) N1-2M0) stages of adenocarcinoma of ascending section of colon residing for treatment in the clinic of surgery and oncology at the base of Non-State Institution of Health Care "The Road Clinical Hospital at the Station Saratov II" of The Public Corporation "Russian Railways" during 2012-2016. The diagnosis was verified using such common technique as colonoscopy with express-cytological analysis. The distribution of patients on observation groups was implemented after operative treatment (right-side hemicolectomy) and by results of planned pathomorphological analysis. The comparative evaluation was carried out concerning cellular composition of peripheral blood, sub-population composition of lymphocytes and content in blood of adrenocorticotropin, cortisol and somatotrophic hormone. The pathogenic relationship is established between progressively increasing of level of cortisol in blood of patients, immunodeficiency on T- and then on B-system of lymphocytes, increasing of level of somatotrophic hormone and development of local metastases. The diagnostic criteria of transition of local stage of adenocarcinoma of ascending part of colon to locally prevalent form is progressively increasing content of cortisol, adrenocorticotropin and somatotrophic hormone in blood against the background of increasing lymphopenia, monocytopenia, T-dependent immunodeficiency. The monitoring of indices of level of lymphocytes, monocytes of blood and their sub-population composition, content of cortisol and somatotrophic hormone in blood can be used as criteria of prevalence of neoplasia in case of clinically non-manifesting metastases.

Key words: adenocarcinoma of ascending section of colon; immune status; hormonal status.

For citation: Chesnokova N.P., Barsukov V.Yu., Agabekov A.I., Rzaeva T.Sh. The alterations of cellular composition of blood and hormonal balance under adenocarcinoma of ascending part of colon as diagnostic criteria of development of processes of metastasis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(5): 306-309. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-306-309>

For correspondence: *Rzaeva T.Sh.* student of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The V.I. Razumovsky Saratov State Medical University", e-mail: tutu.rzaeva96@mail.ru

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 14.12.2017
Accepted 16.01.20

Проблемы этиологии и патогенеза онкологических заболеваний остаются актуальными, несмотря на значительные достижения в онкогенетике отечественных и зарубежных исследователей, определивших общие закономерности малигнизации клеток различной морфофункциональной организации.

В настоящее время очевидно, что совершенствование методов оперативного вмешательства, принципов полихимиотерапии и лучевой терапии при неоплазиях различной локализации не препятствует росту онкопатологии.

Одним из наиболее часто встречающихся заболеваний в онкологической практике является рак толстой кишки. Согласно данным литературы в России с 1960 по 2010 г. число первично заболевших колоректальным раком (КРР) или карциномой толстой кишки возросло в 7 раз, а за последние 10 лет количество больных КРР увеличилось на 22% [1].

Процесс малигнизации клеток при КРР, как и при неоплазиях другой локализации, включает экспрессию протоонкогенов, подавление функции супрессирующих генов и генов апоптоза. Так, в случаях развития аденокарциномы толстой кишки наблюдаются мутации генов *K-ras*, *N-ras*, кодирующих образование онкобелков цитоплазматической мембраны, снижение экспрессии гена *DCC*, ведущее к метастазированию опухолевых клеток, а также мутации гена *p53*, нарушение экспрессии генов и взаимодействия белков *E-кадгерина* и *В-катенина* [2].

Однако вышеуказанные молекулярно-клеточные механизмы развития онкогенно-трансформированных клеток при аденокарциноме восходящего отдела ободочной кишки не находят пока реализации в диагностике и комплексной терапии указанной патологии. Это обусловлено тем, что проблемы патогенеза злокачественных новообразований и механизмы прогрессирования онкопатологии, в частности аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки, ещё далеки от разрешения [3].

Организм человека постоянно подвергается воздействию канцерогенов различной природы, в связи с чем малигнизация клеток возникает достаточно часто, между тем онкозаболевания формируются лишь в случаях недостаточности механизмов элиминации атипичных клеток. Последние, как известно, обеспечиваются при участии иммунологических механизмов защиты и факторов неспецифической резистентности к опухолевым клеткам, определяемых в значительной мере характером системного действия опухоли на организм, а также состоянием гормональных влияний на лимфоноцитарную систему [4].

До настоящего момента остаются неизученными динамика и механизмы развития системных метаболических и функциональных расстройств при аденокарциноме восходящего отдела ободочной кишки. Между тем установление закономерностей паранеопластических расстройств в локальных и местно-распространённых стадиях заболевания позволило бы в значительной мере расширить диагностические и прогностические крите-

рии опухолевого роста, а также дать более объективную оценку формирования клинически неманифестирующих метастазов.

Цель исследования – патогенетически обосновать новые диагностические критерии развития в локальных и местно-распространённых стадиях аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки в соответствии с мониторингом показателей системных паранеопластических расстройств: содержания в крови адренокортикотропного гормона (АКТГ), кортизола, соматотропного гормона (СТГ) а также клеточного состава и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови.

Материал и методы. Для решения поставленных в работе задач проведена сравнительная оценка гормонального баланса крови, клеточного состава периферической крови, субпопуляционного состава лимфоцитов.

Выполнено комплексное клиничко-лабораторное обследование 60 онкологических больных, находящихся на стационарном лечении в клинике хирургии и онкологии факультета повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России на базе НУЗ «Дорожная клиническая больница на станции Саратов II» ОАО «РЖД» в период с 2013 по 2015 г. 1-я группа наблюдения включала 30 пациентов с локальными (T1–2 N0M0) стадиями аденокарциномы ободочной кишки, 2-я группа – 30 пациентов с местно-распространёнными (T3–4 (a, b) N0M0, T3–4 (a, b) N1–2M0) стадиями указанной патологии. Группу контроля составили 30 пациентов без клинически выраженных проявлений какой-либо патологии. Группы исключения составили пациенты с сопутствующими или предшествующими онкологическими и аллергическими заболеваниями, эндокринопатиями, декомпенсированными формами висцеральной патологии.

Верификацию диагноза аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки производили на основе традиционного клиничко-лабораторного обследования пациентов с использованием колоноскопии, рентгенологического исследования, компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии, ультразвукового исследования органов брюшной полости, цитологического и гистологического методов исследований. Клеточный состав крови оценивали на аппарате Sysmex-K1000, а также с помощью световой микроскопии. Оценку субпопуляционного состава лимфоцитов (CD3-, CD4-, CD8-T-лимфоциты, CD19-B-лимфоциты, CD16-лимфоциты) периферической крови проводили методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител. Исследование в крови иммуноглобулинов классов G, A, M выполнено методом радиальной иммунодиффузии. Уровни АКТГ, кортизола и СТГ крови определяли с помощью твердофазного планшетного иммуноферментного анализа.

Результаты и обсуждение. Прежде всего была проведена сравнительная оценка клеточного состава пери-

Таблица 1

Показатели содержания в крови СТГ, АКТГ и кортизола у больных аденокарциномой восходящего отдела ободочной кишки

Показатель	Группы сравнения				
	контрольная	больные аденокарциномой			
		Локальные стадии заболевания (T1–2 N0M0)		местно-распространённые стадии заболевания (T3–4 (a, b) N0M0, T3–4 (a, b) N1–2M0)	
$M \pm m$	$M \pm m$	p	$M \pm m$	p/p_1	
СТГ (0,5–7,0 нг/мл)	5,3 ± 0,28	6,2 ± 0,24	>0,05	10,2 ± 1,1	$p < 0,001$ $p_1 < 0,001$
Кортизол (150–660 нмоль/л)	323,5 ± 29,3	402,8 ± 25,2	<0,001	680,4 ± 28,4	$p < 0,001$ $p_1 < 0,001$
АКТГ (8,3–57,8 пг/мл)	37,7 ± 2,6	60,7 ± 2,2	<0,001	42,6 ± 2,8	$p < 0,001$ $p_1 = 0,001$

Примечание. p_1 – рассчитано по отношению к соответствующим показателям у больных с локальными стадиями этой же формы патологии. Здесь и в табл 2 и 3: p – рассчитано по отношению к соответствующим показателям группы контроля.

ферической крови, а также субпопуляционного состава лимфоцитов в различных стадиях аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки.

Оказалось, что развитие локальных стадий аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки сопровождалось изменением клеточного состава крови в виде абсолютной и относительной лимфопении и моноцитопении. Далее представляло интерес выяснить характер изменений субпопуляционного состава лимфоцитов. При этом была установлена недостаточность клеточного звена иммунных реакций, на что указывало снижение уровня в крови субпопуляции CD3⁺-лимфоцитов за счёт субпопуляции CD4⁺-Th. Одновременно наблюдалось снижение соотношения CD4⁺/CD8⁺, а также содержания CD16⁺-лимфоцитов (натуральных киллеров). Количество CD19⁺-В-лимфоцитов практически не изменялось.

В последующих наблюдениях устанавливали, связаны ли изменения клеточного состава периферической крови и субпопуляционного состава лимфоцитов с развитием гормонального дисбаланса, закономерно сопутствующего онкопатологии [5].

Для решения этой задачи определяли содержание в крови АКТГ, глюкокортикоидов, СТГ.

Как известно, развитие стрессорных ситуаций, в частности онкологических заболеваний, закономерно сочетается с усилением биологических эффектов гормонов адаптации, в то время как СТГ обеспечивает развитие ростстимулирующих влияний на клетки различной морфофункциональной организации как в норме, так и при онкопатологии [6].

Результаты проведенных нами исследований позволили установить резкое возрастание содержания в крови АКТГ, кортизола при отсутствии изменения содержания СТГ (табл. 1).

Таким образом, при формировании локальных стадий аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки обнаруживается параллелизм с усилением центрального влияния аденогипофиза на корковый слой коры надпочечников.

В свою очередь глюкокортикоиды обеспечивают развитие лизиса и апоптоза лимфоидной ткани, вторичного иммунодефицита. Последний является одним из патогенетических факторов недостаточности элиминации опухолевых клеток, реализуемой при участии клеточного звена иммунитета, субпопуляционного состава лимфоцитов, а также моноцитарно-макрофагальной системы [7].

Последующие наблюдения, проведенные в местно-распространённых стадиях аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки, позволили установить прогрессирующий характер нарушений гормонального баланса и иммунологического статуса. При этом имело место прогрессирующее

возрастание уровня кортизола в крови при одновременном снижении содержания АКТГ по сравнению с аналогичными показателями в локальных стадиях патологии. Этот факт свидетельствует о сохранении принципа обратной связи между интенсивностью АКТГ и глюкокортикоидов. Одновременно наблюдалось увеличение содержания СТГ в крови.

Выявленные сдвиги гормонального баланса в местно-распространённых стадиях заболевания сочетались с развитием нейтрофильного лейкоцитоза, сдвигом влево, прогрессирующими моноцитопенией, лимфопенией за счёт CD3⁺-, CD4⁺-, CD16⁺- лимфоцитов. Одновременно отмечалось незначительное снижение уровня CD19⁺-В-лимфоцитов, обеспечивающих гуморальное звено иммунитета (табл. 2).

Таким образом, по мере развития локальных и местно-распространённых стадий аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки возникали одномоментные на-

Таблица 2

Показатели клеточного состава периферической крови у больных аденокарциномой восходящего отдела ободочной кишки при локальных и местно-распространённых стадиях заболевания

Показатель	Группы наблюдения				
	контрольная	больные аденокарциномой			
		Локальные стадии заболевания (T1–2 N0M0)		местно-распространённые стадии заболевания (T3–4 (a, b) N0M0, T3–4 (a, b) N1–2M0)	
$M + m$	$M + m$	p	$M + m$	p/p_1	
Общее число лейкоцитов, ·10 ⁹ /л	6,3 ± 0,17	6,8 ± 0,19	0,05	14,6 ± 0,61	$p < 0,001$ $p_1 < 0,001$
Абсолютное число лимфоцитов, ·10 ⁹ /л	2,2 ± 0,09	1,3 ± 0,05	<0,001	0,8 ± 0,02	$p < 0,001$ $p_1 < 0,001$
Содержание палочкоядерных лейкоцитов, %	2,3 ± 0,06	2,5 ± 0,08	<0,05	10,2 ± 0,39	$p < 0,001$ $p_1 < 0,001$
Содержание сегментоядерных лейкоцитов, %	51,7 ± 2,48	53,5 ± 2,5	>0,05	56,1 ± 2,7	$p > 0,05$ $p_1 > 0,05$
Содержание моноцитов, %	5,6 ± 0,17	2,3 ± 0,09	<0,001	1,7 ± 0,06	$p < 0,001$ $p_1 < 0,001$
Содержание эозинофилов, %	3,1 ± 0,08	3,2 ± 0,09	0,05	5,4 ± 0,11	$p < 0,001$ $p_1 < 0,001$
Содержание лимфоцитов, %	30,1 ± 1,31	21,7 ± 1,02	<0,001	18,9 ± 0,81	$p < 0,001$ $p_1 < 0,05$

Таблица 3

Показатели содержания в крови отдельных субпопуляций лимфоцитов при аденокарциноме восходящего отдела ободочной кишки в локальных (Т1–2 N0M0) и местно-распространённых (Т3–4 (а, b) N0M0, Т3–4 (а, b) N1–2M0) стадиях развития неоплазии

Показатель	Группы наблюдения				
	контрольная	больные аденокарциномой			местно-распространённые стадии заболевания (Т3–4 (а, b) N0M0, Т3–4 (а, b) N1–2M0)
		Локальные стадии заболевания (Т1–2 N0M0)	<i>p</i>		
<i>M ± m</i>	<i>M ± m</i>	<i>p</i>	<i>M ± m</i>	<i>p/p₁</i>	
CD3, %	62,8 ± 3,03	44,9 ± 2,11	< 0,001	32,4 ± 1,52	<i>p</i> < 0,001 <i>p₁</i> < 0,001
CD4, %	41,4 ± 1,88	24,2 ± 1,08	< 0,001	17,1 ± 0,55	<i>p</i> < 0,001 <i>p₁</i> < 0,001
CD8, %	21,4 ± 0,71	20,7 ± 0,87	0,05	15,3 ± 0,46	<i>p</i> < 0,001 <i>p₁</i> < 0,001
CD4/CD8	1,93 ± 0,061	1,17 ± 0,037	< 0,001	1,12 ± 0,028	<i>p</i> < 0,001 <i>p₁</i> > 0,05
CD16, %	16,8 ± 0,41	12,3 ± 0,31	< 0,001	10,7 ± 0,27	<i>p</i> < 0,001 <i>p₁</i> < 0,001
CD19, %	21,2 ± 0,86	19,1 ± 0,63	0,05	17,6 ± 0,58	<i>p</i> < 0,05 <i>p₁</i> > 0,05

Примечание. *p₁* - рассчитано по отношению к соответствующим показателям у больных с I–II стадией этой же формы патологии.

рушения баланса гормонов, регулирующих пролиферативную активность лимфоидной ткани, а также клеточного и гуморального звеньев иммунитета, обеспечивающих элиминацию опухолевых клеток (табл. 3).

Выводы. 1. Малигнизация клеток и их активация в локальных стадиях развития аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки закономерно сочетаются с выраженными изменениями клеточного состава периферической крови в виде моноцитопении, лимфопении, снижения уровня CD4⁺-Т-лимфоцитов, соотношения CD4⁺/CD8⁺-Т-лимфоцитов, а также CD16⁺-лимфоцитов.

2. При развитии местно-распространённых стадий заболевания наблюдаются более выраженные изменения клеточного состава периферической крови в виде нейтрофильного лейкоцитоза со сдвигом влево, эозинофилии, а также прогрессирующих лимфо- и моноцитопении, снижения уровня CD3⁺-, CD4⁺-Т-лимфоцитов, CD16⁺-лимфоцитов. Уровень CD19⁺-В-лимфоцитов несколько снижается по сравнению с показателями контрольной группы наблюдения.

3. Динамические изменения клеточного состава крови и субпопуляционного состава лимфоцитов в динамике распространения опухолевого процесса продемонстрировали взаимосвязь с развитием гормонального дисбаланса в виде увеличения содержания в крови гормонов адаптации (АКТГ, кортизола), вызывающих процессы лизиса и апоптоза лимфоидной ткани, а также повышение в крови уровня СТГ – ростстимулирующего фактора.

4. Диагностическими критериями перехода локальной стадии аденокарциномы восходящего отдела ободочной кишки в местно-распространённую форму являются прогрессирующее увеличение содержания в крови кортизола, АКТГ, СТГ на фоне усиливающегося лимфопении, моноцитопении, Т-зависимого иммунодефицита.

5. Мониторинг показателей уровня лимфоцитов, моноцитов крови и их субпопуляционный состав, содержание в крови кортизола и СТГ могут быть использованы в качестве дополнительных критериев распространения неоплазии при клинически неманифестирующих метастазах.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусова Е.А. Воспалительные заболевания толстой кишки как предраковые заболевания. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2002; 12 (4): 56-62.
2. Глушанкова Н.А., Житняк И.Ю., Айолло Д.В., Рубцова С.Н. Роль Е-кадхерина в неопластической эволюции эпителиальных клеток. *Успехи молекулярной онкологии*. 2014; 1: 12-7.
3. Воробьев Г.И., Одарюк Т. С., Шельгин Ю. А. Диагностика и лечение рака толстой кишки. *Русский медицинский журнал*. 1998; 19 (6): 1244-56
4. Попков В.М., Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю., ред. *Канцерогенез: патофизиологические и клинические аспекты*. Саратов: СГМУ; 2011.
5. Волкова М.А., ред. *Клиническая онкогематология: руководство для врачей*. (2-е изд.). М.: Медицина; 2007.
6. Попков В.М., Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю., ред. *Современная онкология: проблемы и возможности их решения*. Саратов: СГМУ; 2012.
7. Попков В.М., Чеснокова Н.П., Захарова Н.Б. *Цитокины: биологическая роль в развитии реакций адаптации и повреждения в условиях нормы и патологии различного генеза*. Попков В.М., Чеснокова Н.П., ред. Саратов: Изд-во Саратов. гос. мед. ун-та; 2016.

REFERENCES

1. Belousova E.A. Inflammatory diseases of a thick gut as precancer diseases// *Vestnik gastroenterologii, hepatologii, coloproctologii*. 2002; 12(4): 56-62. (in Russian)
2. Glushankova N.A., Zhitnyak I.Yu., Ayollo D.V., Rubtsova S.N. Role E-kadherina in neoplastic evolution the epithelialnykh of cages. *Uspekhi molekularnoy onkologii*. 2014; 1: 12-7 (in Russian)
3. Vorob'ev G.I., Odaryuk T. S., Shelygin Yu. A. Diagnostics and cancer therapy of a thick gut. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 1998; 19 (6): 1244-56. (in Russian)
4. Popkov V.M., Chesnokova N.P., Badgers V.Yu., eds. *Cancerogenesis: pathophysiological and clinical aspects [Kantserogenez: patofiziologicheskie i klinicheskie aspekty]*. Saratov: Saratovskiy gosudarstvennyi meditsinskiy universitet; 2011. (in Russian)
5. Volkova M.A., ed.. *Clinical haemato-oncology: the management for doctors [Klinicheskaya onkogematologiya: rukovodstvo dlya vrachey]*. 2nd ed. Moscow: Meditsina; 2007. (in Russian)
6. Popkov V.M., Chesnokova N.P., Badgers V.Yu., eds. *Modern oncology: problems and possibilities of their decision [Sovremennaya onkologiya: problemy i vozmozhnosti ikh resheniya]*. Saratov: Saratovskiy gosudarstvennyi meditsinskiy universitet; 2012. (in Russian)
7. Popkov V.M., Chesnokova N.P., Zakharova N.B. *Tsitokiny: a biological role in development of reactions of adaptation and damage to conditions of norm and pathology of various genesis [Tsitokiny: biologicheskaya rol' v razvitiy reaktsiy adaptatsii i povrezhdeniya v usloviyakh normy i patologii razlichnogo geneza]*. Popkov V.M., Chesnokova N.P., eds. Saratov: Saratovskiy gosudarstvennyi meditsinskiy universitet; 2016. (in Russian)

Поступила 14.12.17

Принята к печати 16.01.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.36-002-022-078.33

Кюрегян К.К.^{1,2}, Потёмкин И.А.^{1,2}, Лопатухина М.А.³, Попова О.Е.³, Исаева О.В.^{1,2}, Малинникова Е.Ю.^{1,2}, Романенко В.В.⁴, Поляков А.Д.⁵, Михайлов М.И.^{1,2}

ДЛИТЕЛЬНОСТЬ СОХРАНЕНИЯ АНАМНЕСТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА E

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

²ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, 125993, Москва, Россия;

³ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН», 142782, Москва, Россия;

⁴ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии Свердловской области, 620078, Екатеринбург, Россия

⁵Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Белгородской области, 308023, Белгород, Россия

Цель исследования – определение длительности сохранения антител к вирусу гепатита E (анти-ВГЕ) после перенесённой инфекции. Обследованы ветераны военных действий в Афганистане, находившиеся в этом эндемичном по гепатиту E(ГЕ) регионе в составе ограниченного контингента советских войск в конце 70-х– начале 80-х годов. В среднем через 20 лет после окончания службы в Афганистане доля серопозитивных лиц составила 30% (95/317), что многократно превысило аналогичный показатель у лиц, проходивших в те же годы срочную военную службу на территории России (3,9%, 8/208). Исследованы образцы сыворотки крови пожилых людей (старше 60 лет) на анти-ВГЕ IgG и IgM (n = 896). Частота выявления анти-ВГЕ IgG среди пожилых в двух регионах России превышала аналогичный показатель у первичных доноров крови (18,0–27,8% против 4,5–10,0%, p < 0,01). Выявление анти-ВГЕ IgM у пожилых (2,7–6,9%) указывает на текущую или недавно перенесённую инфекцию. Результаты свидетельствуют о том, что анти-ВГЕ IgG могут сохраняться длительное время, несколько десятков лет, после перенесённой инфекции, и это может объяснять широкую распространённость данного маркера среди пожилых людей. Значительная доля лиц может терять детектируемые анти-ВГЕ IgG в течение 20–30 лет. Выявление анти-ВГЕ IgM среди лиц старше 60 лет свидетельствует о сохранении циркуляции вируса в старших возрастных группах, что указывает на необходимость обследования на маркеры ГЕ пожилых людей с заболеваниями печени.

Ключевые слова: гепатит E; анти-ВГЕ; распространённость, длительность гуморального ответа.

Для цитирования: Кюрегян К.К., Потёмкин И.А., Лопатухина М.А., Попова О.Е., Исаева О.В., Малинникова Е.Ю., Романенко В.В., Поляков А.Д., Михайлов М.И. Длительность сохранения анamnестических антител к вирусу гепатита E. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (5): 310-314. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-310-314>

Kyuregyan K.K.^{1,2}, Potemkin I.A.^{1,2}, Lopatukhina M.A.³, Popova O.E.³, Isaeva O.V.^{1,2}, Malinnikova E.Yu.^{1,2}, Romanenko V.V.⁴, Polyakov A.D.⁵, Mikhailov M.I.^{1,2}

THE DURATION OF PRESERVATION OF ANAMNESTIC ANTIBODIES TO HEPATITIS E VIRUS

¹The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "I.I. Mechnikov North-Western State medical University" of Minzdrav of Russia, 191015, St. Petersburg, Russia

²The Federal State Budget Educational Institution of Additional Professional Education "The Russian Medical Academy of Post-graduate Education" of Minzdrav of Russia, 123995, Moscow, Russia

³The Federal State Budget Scientific Institution "The M.P. Chumakov Federal Scientific Center of Research and Development of Immunobiological Preparations" of the Russian Academy of Sciences, 142782, Moscow, Russia

⁴The Federal State Budget Health Care Institution "The Sverdlovsk oblast Center of Hygiene and Epidemiology", 620078, Yekaterinburg, Russia

⁵The Department of the Rospotrebnadzor in the Sverdlovsk oblast, 308023, Belgorod, Russia

The purpose of the study was to determine the duration of antibody response against hepatitis E virus (anti-HEV). Veterans of the war in Afghanistan who were in this endemic region in the late 1970s and early 1980s were tested for anti-HEV. On average, 20 years after the end of military service in Afghanistan, the rate of seropositivity was 30.0% (95/317), which was significantly higher compared to positivity rates in males who were at military service in the territory of Russia during the same period (3.9%, 8/208). At an average of 29.5 years after the visit to Afghanistan anti-HEV prevalence in veterans dropped to 20.0% (21/105), but still significantly exceeded the seroprevalence in general population (3.8%). Serum samples from elderly individuals (>60 years) without known risk factors of infection were also tested for anti-HEV IgG and IgM (n = 896). Anti-HEV IgG detection rates in the elderly from two regions of Russia exceeded those observed of primary blood donors (18.0-27.8% vs. 4.5-10.0%, p<0.01). The detection of anti-HEV IgM in individuals above 60 years (2.7-6.9%) indicates a current or recent infection. Thus, anti-HEV IgG can persist several decades after the infection. This might account for the wide anti-HEV prevalence among the elderly. At the same time, a significant proportion of individuals exposed to HEV lose detectable anti-HEV IgG within 20-30 years. The detection of anti-HEV IgM among the elderly indicates the viral circulation in older age groups, suggesting the need for testing for hepatitis E markers in elderly patients with liver diseases.

Key words: hepatitis E; anti-HEV; seroprevalence, duration of antibody response.

For citation: Kyuregyan K.K., Potemkin I.A., Lopatukhina M.A., Popova O.E., Isaeva O.V., Malinnikova E.Yu., Romanenko V.V., Polyakov A.D., Mikhailov M.I. The duration of preservation of anamnestic antibodies to hepatitis E virus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(5): 310-314. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-310-314>

For correspondence: Kyuregyan K.K., doctor of biological sciences, chief researcher of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "I.I. Mechnikov North-Western State medical University", leading researcher of the Laboratory of Viral Hepatitis of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "I.I. Mechnikov North-Western State medical University", e-mail: karen-kyuregyan@yandex.ru

Information about authors:

Kyuregyan K.K., <http://orcid.org/0000-0002-3599-117X>
Potemkin I.A., <https://orcid.org/0000-0001-7559-4219>
Lopatukhina M.A., <https://orcid.org/0000-0001-6853-4154>
Isaeva O.V., <https://orcid.org/0000-0002-2656-3667>
Malinnikova E.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5501-5707>
Mikhailov M.I., <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

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

Acknowledgment. The study was carried out with financial support of Minobrnauka of Russia, unique identifier of the Project RFMEF161316X0057.

Received 06.12.2017
Accepted 16.01.2018

Введение. Гепатит Е (ГЕ) является острым заболеванием печени вирусной этиологии, способным принимать хронический характер при иммуносупрессии [1]. Заболевание широко распространено в мире, по данным ВОЗ ежегодно ГЕ болеет около 20 млн человек, преимущественно в тропических странах [2]. Вирус гепатита Е (ВГЕ) относится к группе РНК-содержащих безоболочечных вирусов, выделенных в отдельное семейство *Hepeviridae* [3]. ВГЕ открыт в начале 80-х годов М.С. Балаяном и соавт. при расследовании вспышек острогепатита неясной этиологии среди ограниченного контингента советских войск в Афганистане [4]. Считается, что ГЕ имеет две формы, которые определяются генотипом вируса. ВГЕ-инфекция, вызываемая генотипами 1 и 2 ВГЕ, широко распространена в развивающихся странах Азии (Индия, Пакистан) и Африки (Судан, Уганда) [5]. Эта форма инфекции является антропонозом, передается фекально-орально, преимущественно через контаминированную воду, вызывает крупные вспышки и спорадические случаи заболевания и не встречается в странах умеренного климата (за исключением завозных случаев) [6]. Инфекция, вызываемая генотипами 3 и 4 ВГЕ, относительно широко распространена в странах умеренного климата, является антропозоонозом, резервуаром которого служат домашние и дикие свиньи, олени [7]. Эта форма инфекции, по-видимому, часто протекает бессимптомно, что ведёт к формированию анamnестических антител (анти-ВГЕ IgG) у большого числа лиц без острого гепатита в анамнезе [8]. Высказываются предположения, что эта форма инфекции является системным заболеванием с разнообразным комплексом симптомов, включая неврологические, среди которых заболевание печени является частым, но не обязательным проявлением [9].

Лабораторная диагностика ГЕ основана на определении анти-ВГЕ классов IgM и IgG методом иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотке крови, РНК ВГЕ в образцах стула или сыворотки/плазмы крови [10]. Анти-ВГЕ IgG являются протективными и обеспечивают защиту от повторного заражения [11]. Одним из нерешённых вопросов лабораторной диагностики ГЕ, важным для надзора за данной инфекцией и понимания закономерностей её циркуляции, является длительность сохранения анти-ВГЕ IgG после перенесённой инфекции. Мнения исследователей варьируются от уверенности в пожизненном сохранении анamnестических антител, как после перенесённого гепатита А [12–14], до предположений о постепенном исчезновении в течение 10–20 лет после заболевания [15]. Фактические данные по этому вопросу крайне

ограничены и получены в гиперэндемичных регионах, где высока вероятность неоднократного контакта с ВГЕ.

Второй нерешённой задачей диагностики ГЕ, сопряжённой с первой, является резкое увеличение числа серопозитивных лиц в старших возрастных группах по сравнению с более молодым населением, наблюдаемое в странах умеренного климата [16–18]. Является ли это следствием скрытой циркуляции ВГЕ среди пожилых людей или отражает встречу с вирусом в отдалённом прошлом, до сих пор не установлено.

Целью исследования являлось определение длительности сохранения анти-ВГЕ после перенесённой инфекции. Для этого обследованы ветераны военных действий в Афганистане, находившиеся в этом эндемичном по ГЕ регионе в составе ограниченного контингента советских войск (ОКСВ) в конце 70-х – начале 80-х годов, в среднем через 20 и 30 лет после возвращения в Россию, т. е. в неэндемичный регион. Второй задачей исследования являлось определение распространённости серологических маркёров перенесённой и текущей инфекции ВГЕ среди лиц старшего возраста, проживающих в России.

Материал и методы. Исследованы пробы сыворотки крови ветеранов ОКСВ, проходивших срочную службу в Афганистане в 1979–1989 гг. и постоянно проживающих в Свердловской области. Пробы сыворотки собраны в 2004 и 2014 гг. В подгруппе лиц, обследованных в 2004 г. ($n = 317$, все мужчины), средний возраст составил 40 лет, средняя продолжительность времени после пребывания в Афганистане 20 лет. Для этой когорты в качестве группы сравнения обследованы 208 жителей Свердловской области, проходивших срочную военную службу в эти же годы (1979–1989) на территории России. Вторая подгруппа ветеранов ОКСВ, постоянно проживающих в Свердловской области, включала 105 человек (все мужчины), средний возраст в этой подгруппе составил 50,2 года (45–70 лет), средняя продолжительность времени после пребывания в Афганистане 29,5 лет (25–35 лет). Для данной подгруппы в качестве группы сравнения выбраны 398 человек в возрасте от 20 до 59 лет, представляющих условно здоровое население Свердловской области (первичные доноры крови; пациенты поликлиник, не имеющие инфекционных заболеваний).

В группе пожилых людей обследовано 896 человек в возрасте от 60 лет до 101 года, средний возраст $75,5 \pm 7,8$ года, соотношение мужчин и женщин в когорте составило 1:1,6. В данную когорту вошли жители двух регионов России – Бел-

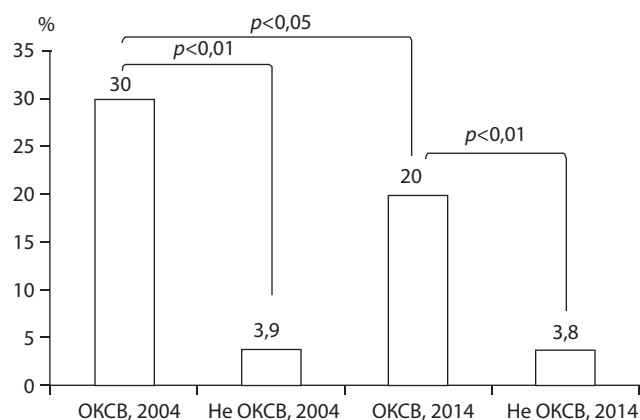


Рис. 1. Частота выявления анти-ВГЕ IgG среди ветеранов войны в Афганистане (ОКСВ) и в группе сравнения (не ОКСВ) при обследовании в 2004 и 2014 гг.

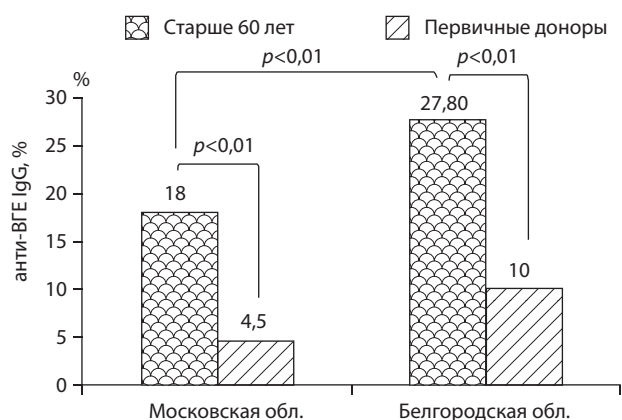


Рис. 2. Частота выявления анти-ВГЕ IgG у пожилых людей (старше 60 лет) и у первичных доноров крови в двух регионах Российской Федерации.

Для каждой выборки приведены показатели достоверности различий ($p < 0,01$) на основании критерия Хи-квадрат с поправкой Йетса.

городской области ($n = 306$, средний возраст $73,6 \pm 9,5$ года (от 60 лет до 101 года), соотношение мужчин и женщин 1:0,8) и Московской области ($n = 590$, средний возраст $76,5 \pm 6,5$ года (от 60 до 96 лет), соотношение мужчин и женщин 1:1,8).

От всех участников исследования получены информированное согласие и анкеты, отражающие демографические данные, сведения о перенесённых заболеваниях печени, факторах риска инфицирования энтеральными и парентеральными гепатитами. Ни у кого из участников исследования не было признаков острого заболевания печени по результатам первичного медицинского обследования.

Во всех образцах сыворотки крови определяли анти-ВГЕ классов IgG и IgM методом ИФА с использованием наборов реагентов НПО «Диагностические системы» («ДС-ИФА-АНТИ-НЕV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-НЕV-M») согласно инструкции производителя. В образцах, полученных от ветеранов ОКСВ в 2014 г., определяли концентрацию анти-ВГЕ IgG в МЕ/мл. Для этого лиофилизированный стандарт ВОЗ для анти-ВГЕ (NIBSC code: 95/584) восстанавливали стерильной водой до концентрации 100 ед. в 1 мл (МЕ/мл) в соответствии с инструкцией производителя. Из восстановленного стандарта готовили в стерильной воде серию разведений в диапазоне концентраций от 10 до 0,01 МЕ/мл. Полученные разведения

тестировали на анти-ВГЕ IgG в наборе «ДС-ИФА-АНТИ-НЕV-G» на одной плашке с исследуемыми клиническими образцами согласно инструкции производителя. На основании полученных для разведений стандарта значений оптической плотности строили калибровочную кривую, с помощью которой определяли концентрацию анти-ВГЕ (в МЕ/мл) в каждом клиническом образце.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы EXCEL 2003 и программы статистической обработки данных GraphPad Prism 4. Для оценки достоверности различий значений показателей в сравниваемых группах использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса (различия оценивались как достоверные при вероятности 95%, $p < 0,05$).

Результаты. Частота выявления анти-ВГЕ IgG среди ветеранов ОКСВ при обследовании в 2004 г., в среднем через 20 лет после окончания службы в Афганистане, составила 30% (95/317), что многократно превысило аналогичный показатель среди лиц, проходивших в те же годы срочную военную службу на территории России (3,9%, 8/208) (рис. 1). При обследовании в 2014 г. ветеранов ОКСВ, в среднем через 29,5 лет после пребывания в Афганистане, этот показатель достоверно снизился до 20% (21/105), однако по-прежнему достоверно превышал распространённость анти-ВГЕ IgG в общей популяции (см. рис.1). Среди ветеранов ОКСВ, обследованных в 2014 г., выявлены три образца, положительных по анти-ВГЕ IgM (3/105, 2,9%), свидетельствующих о текущей или недавно перенесённой инфекции. Средняя концентрация анти-ВГЕ IgG у ветеранов ОКСВ в среднем через 29,5 лет после пребывания в Афганистане составила 4,7 МЕ/мл (0,6–10,2 МЕ/мл). Из расчёта средней концентрации исключены образцы, содержащие антитела класса IgM. В подгруппе ветеранов ОКСВ, обследованных в 2014 г., только три человека подтвердили, согласно анкетным данным, гепатит, перенесённый во время службы в Афганистане. На момент исследования из этих трёх человек двое были серопозитивными, один – негативным по анти-ВГЕ. В обследованной по длительности срока, прошедшего после пребывания в Афганистане, между серопозитивными и серонегативными ветеранами, он составил соответственно $30,2 \pm 3,4$ и $29,2 \pm 2,8$ лет,

Результаты выявления анти-ВГЕ IgG и IgM среди пожилых людей (старше 60 лет) приведены в таблице. Частота выявления анти-ВГЕ IgG в двух регионах РФ, Московской и Белгородской областях, составила 10,0 и 27,8%, соответственно, при этом различия между регионами достоверны ($p < 0,01$). В качестве показателей сравнения для каждого региона выбраны значения частоты выявления анти-ВГЕ IgG среди первичных доноров крови с нормальным уровнем трансаминаз, полученные нами ранее [19]. В Московской и Белгородской областях показатели серопозитивности среди пожилых людей в несколько раз превышали аналогичные показатели среди первичных доноров крови (рис. 2).

Анализ распространённости анти-ВГЕ IgG среди пожилых показал, что динамика их накопления у населения двух регионов различается. В Белгородской области отмечено достоверное увеличение доли лиц, позитивных по анти-ВГЕ IgG среди лиц старше 70 лет по сравнению с подгруппой в возрасте 60–70 лет (32,6% против 21,6%, $p < 0,05$). В Московской области такой тенденции не было, но отмечено достоверно более частое выявление анти-ВГЕ IgM в подгруппе лиц в возрасте 60–70 лет по сравнению с лицами старше 70 лет (см. табл. 1). Такая закономерность отсутствовала среди пожилого населения Белгородской области, где случаи выявления анти-ВГЕ IgM распределены равномерно в возрастных подгруппах. В целом частота выявления анти-ВГЕ IgM, свидетельствующих о текущей или недавно перенесённой инфекции, достоверно выше среди по-

Частота выявления анти-ВГЕ IgM и IgG у пожилых людей в зависимости от возраста

Показатель	Белгородская область			Московская область		
	60–70 лет	>70 лет	Все >60 лет	Все >60 лет	60–70 лет	>70 лет
Анти-ВГЕ IgG, % (N поз./N общ.)	21,6 (29/134)	32,6 (56/172)	27,8 (85/306)	18,0 (106/590)	17,5 (старше 60 лет) (17/97)	18,1 (89/493)
<i>p</i> *	<0,05		<0,01		>0,05	
Анти-ВГЕ IgM, % (N поз./N общ.)	6,0 (8/134)	7,6 (13/172)	6,9 (21/306)	2,7 (16/590)	6,2 (6/97)	2,0 (10/493)
<i>p</i> *	>0,05		<0,01		<0,05	
Анти-ВГЕ IgM и IgG, % (N поз./N общ.)	4,5 (6/134)	4,1 (7/172)	4,3 (13/306)	1,5 (9/590)	4,1 (4/97)	1,0 (5/493)
<i>p</i> *	>0,05		<0,05		<0,05	
Анти-ВГЕ IgM без IgG, % (N поз./N общ.)	1,5 (2/134)	3,5 (6/172)	2,6 (8/306)	1,2 (7/590)	2,1 (2/97)	1,0 (5/493)
<i>p</i> *	>0,05		>0,05		>0,05	

Примечание. *—критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса.

жилых людей, проживающих в Белгородской области (6,9%), по сравнению с жителями Московской области (2,7%, $p < 0,01$). В Московской области среди лиц в возрасте 60–70 лет частота выявления анти-ВГЕ IgM (6,2%) достигала показателей, наблюдаемых в Белгородской области (см. таблицу). Частота выявления анти-ВГЕ IgM без антител класса IgG была примерно одинаковой во всех обследованных группах (см. таблицу).

Сравнение результатов выявления анти-ВГЕ IgM среди пожилых лиц с аналогичными показателями среди первичных доноров крови в тех же регионах, полученными нами ранее [19], показало отсутствие достоверных различий. В Московской области частота выявления анти-ВГЕ IgM среди первичных доноров составила 3,1% (30/958) против 2,7% среди лиц старше 60 лет ($p > 0,05$) и 6,2% среди лиц в возрасте 60–70 лет ($p > 0,05$). В Белгородской области частота выявления анти-ВГЕ IgM среди первичных доноров крови составила 4,5% (13/291) против 6,9% среди лиц старше 60 лет ($p > 0,05$) и 7,6% среди лиц в возрасте старше 70 лет ($p > 0,05$).

Обсуждение. Целью исследования являлось определение длительности сохранения антител к ВГЕ после перенесённой инфекции. Ветераны ОКСВ, проходившие срочную службу в Афганистане, являются удобной когортой для проведения подобного исследования, поскольку после относительно кратковременного пребывания в гиперэндемичном регионе, где риск встречи с возбудителем высок, они вернулись в неэндемичный регион (Свердловскую область), где риск повторной встречи с ВГЕ относительно невысокий. Можно предполагать, что большинство серопозитивных лиц в этой когорте имеют анти-ВГЕ, образовавшиеся после инфицирования во время службы в Афганистане. Об этом свидетельствует почти десятикратное различие по частоте выявления анти-ВГЕ IgG в когорте ОКСВ и среди лиц в группах сравнения, никогда не посещавших Афганистан. Результаты свидетельствуют о длительности сохранения анамнестических анти-ВГЕ – даже через 30 лет после пребывания в гиперэндемичном регионе доля серопозитивных лиц составляет 20% против 3,8%, характерных для общей популяции в регионе постоянного проживания ветеранов ОКСВ. Прослежено исчезновение антител со временем у значительной доли лиц. Об этом свидетельствует уменьшение на 10% доли серопозитивных лиц через 30 лет после пребывания в гиперэндемичном регионе по сравнению с обследованными через 20 лет после службы в Афганистане. Влияние потенциальной встречи с ВГЕ на территории постоянного проживания обследованных на показатели выявления анти-ВГЕ у ветеранов ОКСВ представляется незначительным, поскольку доля серопозитивных лиц в группах сравнения оставалась одинаковой в течение десятилетнего интервала, с 2004 по 2014 г. Встреча с ВГЕ уже на территории РФ не исключается, что подтверждается случаями выявления анти-ВГЕ IgM у обследованных лиц. Единственным ограничением данного

исследования является тот факт, что в 2004 и 2014 гг. тестировались не одни и те же участники, и полученные результаты не являются отражением динамики антител в одном организме. Достоверное снижение доли серопозитивных лиц в когортах ветеранов ОКСВ, обследованных с десятилетним интервалом, является прямым свидетельством того, что анти-ВГЕ IgG после перенесённой инфекции не сохраняются пожизненно, а исчезают со временем. Результаты свидетельствуют о том, что скорость исчезновения анти-ВГЕ составляет примерно 10% за 10 лет. Концентрации анти-ВГЕ IgG, выявленные среди ветеранов ОКСВ через 30 лет после пребывания в гиперэндемичном регионе, оказались сходными с показателями, регистрируемыми в неэндемичных регионах в общей популяции [20].

По нашим сведениям, это первые данные о многолетней динамике анти-ВГЕ, полученные на неэндемичной территории, где вероятность повторной встречи с возбудителем и соответственно бустирования гуморального ответа относительно невысока. Результаты наблюдений за постинфекционными анти-ВГЕ в эндемичном регионе (Китай) показали, что до 50% серопозитивных лиц теряют антитела в течение 14,5 лет [15]. Эти фактические данные противоречат результатам математического моделирования сохранения анамнестических анти-ВГЕ, согласно которым, на основании пятилетней динамики концентраций анти-ВГЕ, антитела должны сохраняться не менее 50 лет после перенесённой инфекции [14]. После встречи с ВГЕ антитела постепенно, на протяжении 20–30 лет исчезают. Случаи повторного заболевания ГЕ не описаны, что указывает на пожизненное сохранение иммунитета несмотря на исчезновение антител. Наблюдались вспышки ГЕ в одном и том же городе Индии в 1981, 1991, 1997 гг., при этом не зарегистрировано ни одного случая заболевания при последующих вспышках среди тех, кто перенёс инфекцию во время первой вспышки [14]. Понимание длительности сохранения постинфекционных анти-ВГЕ важно с точки зрения двух аспектов изучения ГЕ: во-первых, для разработки стратегии вакцинопрофилактики этой инфекции, во-вторых, для надзора за ВГЕ. В мире опубликовано большое число работ по выявлению анти-ВГЕ в разных группах населения, в том числе у пожилых. Остаётся открытым вопрос, отражают ли эти данные циркуляцию ВГЕ в отдалённом прошлом или указывают на относительно недавнюю встречу с вирусом? Для ответа на этот вопрос нами исследованы пробы сыворотки крови пожилых людей (старше 60 лет) на анти-ВГЕ не только класса IgG, но и IgM, свидетельствующих о текущей или недавней инфекции.

Полученные в настоящем исследовании результаты подтвердили данные о подъёме распространённости анти-ВГЕ среди лиц старшего возраста, полученные в других неэндемичных регионах мира. В Германии частота выявления анти-ВГЕ IgG повышается с возрастом и достигает пика (26%) среди лиц старше 60 лет [16]. Старший возраст сам по себе

является фактором риска наличия анамнестических анти-ВГЕ, маскируя другие возможные факторы риска. В свиноводческом районе Германии анти-ВГЕ выявляются среди свиноводов чаще, чем в общей популяции, но среди лиц старше 50 лет этот показатель достигает более 20% независимо от наличия контакта с животными [21].

Тесная связь между старшим возрастом и наличием анти-ВГЕ IgG, по-видимому, отражает совокупную возможность контакта с вирусом на протяжении жизни. С другой стороны, это может отражать и эффект возрастной когорты, имевшей более высокий риск встречи с вирусом несколько десятилетий назад. Такое предположение подтверждают наши данные о возможности длительного, до 30 лет, сохранения анамнестических анти-ВГЕ. В пользу снижения риска встречи с ВГЕ в течение последних десятилетий свидетельствуют данные P.Christensen и соавт. [22], исследовавших образцы сывороток от доноров крови, собранные в 1983 и 2003 гг. Отмечено снижение распространённости анти-ВГЕ более чем на 10% при одинаковом возрасте доноров в обеих группах [22].

Широкая распространённость анти-ВГЕ IgG среди пожилых людей может быть обусловлена циркуляцией ВГЕ в старших возрастных группах, наблюдающейся в настоящее время. В пользу этого свидетельствуют случаи заболевания ГЕ среди пожилых людей [23, 24], а также частота выявления антител класса IgM, свидетельствующих о недавней инфекции, сходная с таковой в более молодых возрастных группах. Полученные нами результаты выявления анти-ВГЕ IgM у пожилых людей, по-видимому, специфичны, даже если они не подтверждаются выявлением антител класса IgG. В нашем исследовании использовался ИФА-тест, высокая специфичность и чувствительность которого подтверждена при проведении сравнительных испытаний нескольких тест-систем с помощью панелей образцов, содержащих антитела к ВГЕ четырех генотипов, образцов, полученных от здоровых людей и пациентов с гепатитом Е и гепатитом А [25].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что анти-ВГЕ IgG могут сохраняться длительное время, несколько десятилетий, после перенесённой инфекции, и это может объяснить широкую распространённость этого маркера среди пожилых людей. В отличие от гуморального иммунитета к вирусу гепатита А, сохраняющегося пожизненно после перенесённой инфекции, значительная доля лиц может терять детектируемые анти-ВГЕ IgG в течение 20–30 лет. Выявление анти-ВГЕ IgM среди лиц старше 60 лет свидетельствует о сохранении циркуляции вируса в старших возрастных группах, что указывает на необходимость обследования на маркеры ГЕ пожилых людей с заболеваниями печени.

Финансирование. Исследования проведены при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61316X0057.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1 – 18, 20 – 22, 25 см. REFERENCES)

19. Потемкин И.А., Кюрегян К.К., Исаева О.В., Белякова В.В., Майорова О.А., Щибрик Е.В., Поляков А.Д., Малинникова Е.Ю., Михайлов М.И. Распространённость маркеров гепатита Е среди доноров крови в регионах Российской Федерации. *Гематология и трансфузиология*. 2013; 58(4): 26-8.
23. Малинникова Е.Ю., Зайцев О.В., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Ильченко Л.Ю., Михайлов М.И. Сравнительная клиническая характеристика гепатитов А и Е при групповой заболеваемости. *Инфекционные болезни*. 2011; 9 (4): 11-6.
24. Малинникова Е.Ю., Коптук В.Г., Михайлов М.И. Характеристика клинического течения автохтонного гепатита Е в центральном регионе России. *Журнал инфектологии*. 2013; 5 (3): 56-60.

REFERENCES

1. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C et al. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*. 2011;140:1481-9.
2. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
3. Smith D.B., Simmonds P., Jameel S., Emerson S.U., Harrison T.J., Meng X-J et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *Journal of General Virology*. 2015 96 (Pt 5):1191-2.
4. Balayan M.S., Andjaparidze A.G., Savinskaya S.S. et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983; 20: 23-31.
5. Rein D.B., Stevens G.A., Theaker J., Wittenborn J.S., Wiersma S.T. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*. 2012; 55: 988-97.
6. Purcell R.H., Emerson S.U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol*. 2008; 48: 494-503.
7. Pavio N., Meng X.-J., Doceul V. Zoonotic origin of hepatitis E. *Current Opinion in Virology*. 2015; 10: 34-41.
8. Clemente-Casares P., Ramos-Romero C., Ramirez-Gonzalez E., Mas A. Hepatitis E Virus in Industrialized Countries: The Silent Threat. *BioMed Research International*. 2016: 9838041.
9. Mclean B.N., Gulliver J., Dalton H.R. Hepatitis E virus and neurological disorders. *Pract. Neurol*. 2017; 17: 282-8.
10. Khudyakov Y., Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res*. 2011; 161(1): 84-92.
11. Purcell R.H., Emerson S.U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol*. 2008; 48: 494-503.
12. Khuroo M.S., Kamili S., Dar M.J., Jameel S. Hepatitis E and long term antibody status. *Lancet*. 1993; 341-55.
13. Dawson J.G., Mushawar I.K., Chan K.H., Gitnick G.T. Detection of long lasting antibody to hepatitis E virus in US travellers to Pakistan. *Lancet*. 1994; 340-426.
14. Chadha M. S., Walimbe A. M., Arankalle V. A. Retrospective serological analysis of hepatitis E patients: a long-term follow-up study. *Journal of Viral Hepatitis*. 1999. 6: 457-61.
15. Su Y.-Y., Huang S.J., Guo M., Zhao J., Yu H., He W.G et al. Persistence of antibodies acquired by natural hepatitis E virus infection and effects of vaccination. *Clinical Microbiology and Infection*. 2017; 23 (5): 336.e1 - 336.e4.
16. Faber M.S., Wenzel J.J., Jilg W., Thamm M., Höhle M., Stark K. Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18(10): 1654-7.
17. Lagler H., Poepl W., Winkler H., Herkner H., Faas A., Mooseder G., Burgmann H. Hepatitis E virus seroprevalence in Austrian adults: a nationwide cross-sectional study among civilians and military professionals. *PLoS One*. 2014; 9(2):e87669.
18. Mansuy J.M., Gallian P., Dimeglio C., Saune K., Arnaud C., Pelletier B., Morel P., Legrand D., Tiberghien P., Izopet J. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology*. 2016; 63(4):1145-54.
19. Potemkin I.A., Kyuregян K.K., Isaeva O.V., Belyakova V.V., Mayorova O.A., Shhibrik E.V., Polyakov A.D., Malinnikova E.Yu., Mikhailov M.I. Prevalence of hepatitis E in blood donors in different regions of Russian Federation. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2013; 58(4):26-8. (in Russian)
20. Bendall R., Ellis V., Ijaz S., Ali R., Dalton H. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J. Med. Virol*. 2010; 82:799-805.
21. Krumbholz A., Joel S., Dremsek P. et al. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany. *Med. Microbiol. Immunol*. 2014: 203-73.
22. Christensen P.B., Engle R.E., Hjort C. et al. Time Trend of the Prevalence of Hepatitis E Antibodies among Farmers and Blood Donors: A Potential Zoonosis in Denmark. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;47(8):1026-31.
23. Malinnikova E.Yu., Zaytzev O.V., Isaeva O.V., Kyuregян K.K., Il'chenko L.Yu., Mikhailov M.I. Comparative clinical characteristics of hepatitis A and E in outbreaks and cluster cases. *Infektsionnye bolezni*. 2011; 9(4):11-6. (in Russian)
24. Malinnikova E.Yu., Koptuyug V.G., Mikhailov M.I. Characteristics of the clinical course of autochthonous hepatitis E in the central region of Russia. *Zhurnal infektologii*. 2013; 5(3):56-60. (in Russian)
25. Drobeniuc J., Meng J., Reuter G., Greene-Montfort T., Khudyakova N., Dimitrova Z., Kamili S., Teo C.G. Serologic assays specific to immunoglobulin M antibodies against hepatitis E virus: pan-genotypic evaluation of performances. *Clin. Infect. Dis*. 2010; 51(3):e24-7.

Поступила 06.12.17

Принята к печати 16.01.18

МИКРОБИОЛОГИЯ

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:579.873.21-06-078

Лямин А.В., Исмагуллин Д.Д., Жестков А.В., Кондратенко О.В.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОБАКТЕРИОЗОВ У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

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

*Микобактериозы, как группа заболеваний, обусловленных нетуберкулёзными микобактериями, приобретают всё большее значение для пациентов из различных групп риска. Пациенты с муковисцидозом, наряду с больными другими генетическими заболеваниями, входят в группу риска по инфицированию нетуберкулёзными микобактериями. Диагностика микобактериозов у пациентов с муковисцидозом имеет ряд особенностей как на этапе работы с клиническим материалом, так и на этапе идентификации выделенных микроорганизмов. В обзоре представлены современные данные о возможностях лабораторной диагностики микобактериозов с учётом особенностей эпидемиологии, факторов риска, проведения скрининга инфицированности, деkontаминации материала, методов культивирования и идентификации нетуберкулёзных микобактерий у пациентов с муковисцидозом. Приведены данные о росте заболеваемости микобактериозами до 6–13% среди пациентов с муковисцидозом в развитых странах. Показан низкий уровень распространённости микобактериозов среди пациентов с муковисцидозом в Российской Федерации. Описаны факторы риска развития микобактериозов с точки зрения инфицирования различными микроорганизмами, в частности грибами рода *Aspergillus*. Описаны методика двухэтапной деkontаминации мокроты и возможные ограничения по культивированию её в автоматических системах, возможности использования для деkontаминации 1% раствора хлоргексидина и натрия додецилсульфата. Помимо стандартных методик, приводится методика выделения микобактерий, основанная на посеве материала на среды для селективного выделения *Burkholderia cepacia complex*. Описаны возможности идентификации микобактерий с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии. При подготовке обзора использовались источники из международных и отечественных баз данных: Scopus, Web of Science, РИНЦ.*

Ключевые слова: микобактериоз; нетуберкулёзные микобактерии; муковисцидоз; обзор литературы.

Для цитирования: Лямин А.В., Исмагуллин Д.Д., Жестков А.В., Кондратенко О.В. Лабораторная диагностика микобактериозов у пациентов с муковисцидозом. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (5): 315-320. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-315-320>

Lyamin A.V., Ismatullin D.D., Zhestkov A.V., Kondratenko O.V.

THE LABORATORY DIAGNOSTIC IN PATIENTS WITH MUCOVISCIDOSIS: A REVIEW

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

The mycobacterioses as a group of diseases conditioned by non-tuberculosis mycobacteria, acquire even greater significance for patients from various risk groups. The patients with cystic fibrosis along with patients with other genetic diseases, consist risk group of infection with non-tuberculosis mycobacteria.

*The diagnostic of mycobacterioses in patients with cystic fibrosis has a number of peculiarities both at the stage of processing clinical material and the stage of identification of separated microorganisms. The review presents modern data about possibilities of laboratory diagnostic of with regard to characteristics of epidemiology, risk factors, contamination screening, material decontamination, methods of cultivation and identification of non-tuberculosis mycobacteria in patients with cystic fibrosis. The data is presented concerning increasing of morbidity of mycobacterioses up to 6-13% among patients with cystic fibrosis in developed countries. The low level of prevalence of mycobacterioses among patients with cystic fibrosis in the Russian Federation is demonstrated. The risk factors of development of mycobacterioses from point of view of contamination with various microorganisms, particularly with fungi of species *Aspergillus* are described. The technique of two-stage decontamination of phlegm and possible limitations of its cultivation in automated systems and possibilities of using 1% solution of chlorhexidine and sodium dodecyl sulfate for decontamination are described. Besides standard techniques, a technique of separation of mycobacteria is presented based on inoculation of material on medium for selective separation of *Burkholderia cepacia complex*. The possibilities of identification of mycobacteria using MALDI-ToF mass-spectrometry. The review was based on sources from such international and national data bases as Scopus, Web of Science, RINC.*

Key words: mycobacterioses; non-tuberculosis mycobacteria; cystic fibrosis; review.

For citation: Liamin A.V., Ismatullin D.D., Zhestkov A.V., Kondratenko O.V. The laboratory diagnostic in patients with mucoviscidosis: A review. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(5): 315-320. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-5-315-320>

Для корреспонденции: Лямин Артём Викторович, канд. мед. наук, доц. каф. общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии; e-mail: avlyamin@rambler.ru

For correspondence: *Liamin A.V.*, candidate of medical sciences, associate professor of the chair of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Samara State Medical University", e-mail: avlyamin@rambler.ru

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support*

Received 09.01.2018
Accepted 16.01.2018

Актуальность. Муковисцидоз (МВ) – одно из самых распространённых генетических заболеваний, характеризующихся полиорганной дисфункцией в результате нарушения работы экзокринных желез. Часто при МВ патологический процесс реализуется в бронхолёгочной системе, в органах желудочно-кишечного тракта и гепатобилиарной системе; у мужчин возможно поражение урогенитальной системы [1].

По данным регистра 2015 г. в РФ имеются данные о 2916 пациентах с МВ, но реальное число больных может быть больше [2]. Особенностью патогенетических изменений в бронхолёгочной системе при МВ является развитие хронической колонизации, а в дальнейшем и инфекции, вызванной различной микрофлорой. Если в начале жизни ребёнка с МВ колонизация бронхолёгочной системы происходит в первую очередь грамположительной кокковой микрофлорой, то в дальнейшем на первое место выходят грамотрицательные неферментирующие бактерии, которые вызывают тяжёлые хронические формы инфекции. В связи со значительными изменениями в возрастных группах пациентов с МВ во всем мире и на территории РФ, в частности, отмечается тенденция к увеличению количества пациентов старше 18 лет [2, 3]. Возрастает риск колонизации и последующего инфицирования пациентов нетипичной для МВ микрофлорой, к которой можно отнести и нетуберкулёзные микобактерии (НТМ). Эта неоднородная группа представителей семейства *Actinomycetales* вызывает заболевания, получившие единое название – микобактериозы. НТМ – широко распространённые в окружающей среде микроорганизмы, насчитывающие более 200 видов. Около 50 из них являются этиологическими факторами в развитии микобактериозов, для остальных видов НТМ доказательств участия в патологическом процессе недостаточно, они могут быть комменсалами на слизистых оболочках верхних дыхательных путей. НТМ могут стать причиной развития хронической лёгочной инфекции у некоторых групп пациентов с различными воспалительными и структурными изменениями в лёгких: пациенты с туберкулёзом лёгких и с остаточными явлениями после перенесённого заболевания, больные пневмокониозами и хронической обструктивной болезнью лёгких, бронхиальной астмой, саркоидозом, бронхоэктазами [4]. Отдельной группой являются пациенты с иммунодефицитами различной этиологии, у которых микобактериозы могут приобретать генерализованное течение, часто ведущее к летальному исходу [5].

Пациенты с МВ, наряду с большим другими генетическими заболеваниями, входят в группу риска по инфицированию НТМ [5, 6]. Это связано с особенностями патогенеза МВ и с общим увеличением количества пациентов с микобактериозами. На этапе модернизации медицины отсутствуют отечественные стандарты диагностики и терапии микобактериозов у пациентов с МВ. С учётом особенностей микрофлоры, наиболее часто вызывающей хроническую инфекцию лёгких у данной группы пациентов, колонизация или инфекция, вызванная НТМ у пациентов с МВ, может иметь потенциальную опасность, вести к прогрессирующему поражению лёгких и оказывать существенное влияние на течение основного заболевания [6].

Эпидемиология микобактериозов у пациентов с МВ. Пациенты с МВ представляют группу, которая имеет довольно

высокие риски заражения НТМ. Данный факт требует разработки особой тактики ведения, диагностики, профилактики инфицирования пациентов с МВ, у которых развился микобактериоз.

Заболеемость микобактериозами у пациентов с МВ в развитых странах в конце XX века составляла примерно 1 на 100 тыс. [7], в последнее время появляется всё больше публикаций, в которых указывается рост выделения НТМ у пациентов с МВ от 6 до 13% [8, 9].

Распространённость НТМ среди пациентов с МВ в США увеличилась с 1,3%, по результатам исследований, проведённых в 1984 г. [10] до 32% по данным исследований 2005 г. [11]. Если учитывать общую заболеваемость по стране, то по данным регистра Американского фонда МВ распространённость НТМ у пациентов с МВ в среднем составляет 12%, если учитывать показатели заболеваемости в отдельно взятых штатах, то показатели варьируют от 0 до 32%.

При оценке распространённости микобактериозов у пациентов с МВ необходимо учитывать данные в центрах МВ из разных стран, которые могут кардинально различаться между собой. Существует чёткая корреляция по данным крупных исследований, распространённость НТМ в большинстве стран варьирует примерно от 6 до 13% [8–13]. Неизвестно, с чем связано увеличение заболеваемости микобактериозами у пациентов с МВ. Возможно, это обусловлено совершенствованием методов лабораторной диагностики, нельзя исключить и реального роста заболеваемости среди пациентов с МВ.

В РФ по данным регистра пациентов с МВ 2015 г. зарегистрировано 0,9% пациентов с микобактериозами (0,8% у пациентов детского возраста, 1,3% у взрослых пациентов) [2], что значительно меньше, чем в европейских странах и США и, возможно, не отражает истинной картины по распространению НТМ среди пациентов.

В Северной Америке, Европе у пациентов с МВ наиболее часто выделяются культуры, относящиеся к группе медленно растущих микобактерий, а именно представители *Mycobacterium avium complex* (MAC). Эта же группа НТМ чаще всего вызывает бронхолёгочную патологию у пациентов, принадлежащих к различным группам риска, хорошо выделяется и идентифицируется в лабораториях противотуберкулёзной службы. При анализе распространённости НТМ у пациентов с МВ MAC выделялись примерно в 72% случаев [8]. Среди быстрорастущих видов стоит отметить, что во многих профильных центрах имеется высокая доля выявления видов – *M. abscessus complex* (MABSC). Процент выделения MABSC из мокроты у пациентов с МВ колеблется в пределах 16–68% и данный показатель растёт с каждым годом [8, 12, 14, 15].

С чем связан значительный рост выделения представителей быстрорастущих НТМ у пациентов с МВ, в настоящий момент неизвестно. Возможно, имеется связь между увеличением показателей распространённости НТМ с определённым географическим положением и особенностями климата в конкретных регионах, о чём свидетельствуют данные учёных из Европы и Израиля. В Европе наиболее распространёнными считаются представители MABSC, в Израиле чаще всего выделяют *M. simiae* и MABSC [16, 17]. Выделение не-

которых быстрорастущих НТМ в лабораториях противотуберкулёзной службы не всегда является эффективным, что может быть обусловлено снижением кислотоустойчивости некоторых из них, как следствие происходит гибель таких штаммов во время классических методов деконтаминации клинического материала. С другой стороны, рост некоторых быстрорастущих НТМ на жидких средах может появляться на 2–3-и сутки, полученный результат расценивается как контаминация сопутствующей микрофлорой.

Значительные различия в распределении медленно и быстрорастущих НТМ могут быть связаны с тем, что исследования проводятся в разных возрастных категориях пациентов с МВ. МАС чаще всего выделяют у пациентов старших возрастных групп и у пожилых пациентов с более лёгкими формами МВ, тогда как МАВРС выделяют в более молодом возрасте, с более тяжёлыми формами заболевания, обострение которого требует частых внутривенных введений лекарственных препаратов [15, 18, 19]. У детей до 10 лет НТМ встречаются в 10% случаев, у пациентов старше 40 лет НТМ колонизируют дыхательные пути в 30% и более [11]. Помимо вышеупомянутых МАС и МАВРС из клинического материала пациентов с МВ выделяют среди медленно растущих *M. Kansassii* и *M. simiae*, а среди быстрорастущих – *M. fortuitum*.

В России стали появляться публикации о распространении НТМ среди пациентов, наблюдаемых в учреждениях противотуберкулёзной службы, однако пока отсутствуют статистические показатели распространённости НТМ у пациентов с МВ [20]. В большей степени это связано с отсутствием клинических рекомендаций и методических указаний по методам культивирования и идентификации НТМ у пациентов с МВ.

Факторы риска. Наличие МВ является одним из факторов риска, которые приводятся в рекомендациях по диагностике и лечению микобактериозов. В настоящее время отсутствуют чётко сформированные взгляды и доказательства участия конкретных факторов риска, которые можно было бы напрямую связать с заболеваемостью микобактериозами у пациентов с МВ. В большинстве исследований, проведённых в различных странах, приводятся довольно противоречивые данные, но, безусловно, все авторы сходятся во мнении, что распространённость НТМ среди больных с МВ имеет тенденцию к увеличению.

Это может быть связано с увеличением возрастных показателей пациентов – продолжительность жизни увеличилась примерно с 7 до 40 лет [8, 12, 21]. Также это связано с наличием у пациента изменений в лёгких различной этиологии, доказательством чего является увеличение вероятности обнаружения НТМ в образцах мокроты, по результатам лабораторных исследований она достигает 19,7% [22]. Снижение мукоцилиарного клиренса и воспаление дыхательных путей могут способствовать развитию и прогрессированию хронической инфекции, вызванной НТМ. Существует высокий уровень заболеваемости микобактериозами среди пациентов с неклассическими формами МВ, обусловленными «мягкими» мутациями (в D1152H, R75Q, и 5T аллели), которые довольно часто связаны с выделением НТМ из мокроты [23].

Не стоит исключать увеличение распространённости выделения НТМ у пациентов в результате инфицирования некоторыми представителями грамотрицательной микрофлоры. Данные, касающиеся этого вопроса, часто носят противоречивый характер. Инфекции лёгких, вызванные *Paeruginosa*, могут вести как к уменьшению, так и к увеличению распространённости НТМ у пациентов [8, 24]. Такое несоответствие результатов может быть обусловлено малым размером выборки пациентов, различиями в методиках, которые использовались при проведении исследований. Данный

факт необходимо подвергнуть более тщательному анализу в связи с увеличением видового разнообразия грамотрицательной микрофлоры, которая выделяется от пациентов с МВ, отсутствием данных об антагонистическом или синергидном воздействии её на НТМ, наиболее часто встречающиеся у пациентов.

Выделение НТМ из мокроты пациентов с МВ не всегда является критерием постановки диагноза микобактериоз. В отличие от инфекций, вызванных *Paeruginosa*, наличие *Aspergillus fumigatus* в мокроте у пациентов с МВ, особенно при условии развития бронхолёгочного аспергиллёза, напрямую связано с увеличением частоты выделения НТМ [24, 25]. Эта корреляция может быть обусловлена рядом факторов, среди которых наиболее значимым является проводимая терапия при поражении лёгких, вызванном *Aspergillus spp.* Существуют прямые доказательства влияния терапии системными глюкокортикостероидами на повышение заболеваемости микобактериозами пациентов без МВ, что, возможно, влияет и на риск развития микобактериозов у пациентов с МВ при лечении бронхолёгочного аспергиллёза [25–27].

Фактором риска в развитии микобактериозов у пациентов с МВ является применение длительных курсов антибиотикотерапии препаратами с противовоспалительным действием, которые, как правило, назначаются в дозах ниже терапевтических. Долговременное использование таких средств может вести к росту риска формирования на этом фоне не только колонизации лёгких НТМ, но и к развитию резистентности у них к макролидным антибиотикам, что подтверждается в исследованиях по применению азитромицина у пациентов с МВ [18, 28].

Проведены лабораторные исследования, доказывающие, что азитромицин является блокатором процессов аутофагии НТМ, которые проходят внутри макрофагов. Применение этого препарата может влиять на увеличение распространённости НТМ. Опубликованы исследования, в которых выдвигаются предположения о защитных эффектах пролонгированного применения азитромицина [29].

Важным фактором риска в отношении распространения НТМ среди пациентов с МВ можно считать вероятность инфицирования ими в стационаре. Считается, что инфицирование НТМ напрямую от пациента к пациенту является маловероятным событием. В настоящее время появляется все больше научных исследований, результаты которых позволяют предполагать, что вероятность перекрестной передачи НТМ довольно высока. Примером, свидетельствующим о таком пути передачи, является вспышка, зафиксированная в одной из больниц США: у пяти пациентов, находившихся в одной клинике, обнаружены идентичные штаммы *M. abscessus massiliense*. Нельзя исключать рост подобных случаев и в других регионах [4].

Скрининговые исследования. Несмотря на доказанное клиническое значение и роль НТМ как этиологического фактора воспаления у пациентов с МВ, до сих пор остаётся открытым вопрос о целесообразности скрининговых исследований у этих пациентов на НТМ. Необходимо провести чёткую границу между скрининговыми исследованиями и лабораторной диагностикой для подтверждения диагноза. В понятие скрининг входит отбор и исследование материала у пациентов с МВ в случае полного отсутствия клинических и рентгенологических проявлений микобактериоза. Для подтверждения диагноза микобактериоз Американским торакальным обществом установлена совокупность нескольких факторов, оказывающих влияние на верификацию диагноза, а именно получение трёх утренних образцов, собранных в разные дни с интервалом около недели, что обеспечивает снижение контаминации клинического материала НТМ из окружающей среды [30].

Основной причиной введения такого подхода к диагностике микобактериозов явились результаты проведённого в Японии исследования, в котором получены данные о диагностической значимости выделения НТМ одного вида не менее чем в двух образцах мокроты. В случае использования в качестве исследуемого материала бронхоальвеолярного лаважа для верификации диагноза достаточно однократного выделения микобактерий [31, 32]. Такие же критерии используются для верификации диагноза микобактериоз у пациентов без МВ.

Отсутствуют однозначные данные о целесообразности проведения скрининга у всех пациентов или выделения определённых групп среди пациентов с МВ. Не установлены границы оптимальной регулярности и критерии качества таких исследований, что является важным фактом, если принимать во внимание повсеместное распространение НТМ и их роль в качестве транзитной микрофлоры, контаминирующей верхние дыхательные пути. Частое исследование на них может вести к увеличению ложноположительных результатов. Большинство авторов сходятся во мнении, что пациенты с патологией бронхолёгочной системы в терминальной стадии подвержены более частому риску инфицирования НТМ, поэтому у них скрининговые исследования необходимо проводить чаще. Для остальных пациентов с МВ достаточно одного исследования в год [4, 18].

Существует и ряд вопросов о том, какой биоматериал целесообразно использовать для скрининга НТМ. Американским фондом муковисцидоза (CFF) и Европейским обществом по муковисцидозу (ECFS) принято, что в качестве материала для анализа распространения НТМ нужно использовать индуцированную или свободно отделяемую мокроту. Возможно использование бронхиальных смывов, микроскопия которых позволяет определить бактериальную нагрузку для оценки эффективности проводимой деконтаминации. Нежелательно использование мазков из орофарингеальной зоны, что обусловлено возможной контаминацией верхних дыхательных путей НТМ из окружающей среды и получение ложноположительных результатов [33].

Деконтаминация материала. Стандартные методики посева при исследовании на микобактерии нестерильного клинического материала требуют обязательной его деконтаминации, основной целью которой является удаление из пробы быстрорастущей кислотоустойчивой микрофлоры, которая в случае активного роста затрудняет выделение и идентификацию НТМ.

В соответствии со стандартными протоколами деконтаминации и разжижения мокроты, определёнными Приказом Минздрава России от 21 марта 2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации», широко проводятся процедуры с использованием N-ацетил-L-цистеина (NALC) и гидроксида натрия (NaOH). NALC (0,5%) используется в качестве муколитика для быстрого и качественного разжижения мокроты, NaOH (2%) – как деконтаминирующее средство. Вследствие низких концентраций данных веществ они практически не оказывают ингибирующего действия на микобактерии и способствуют улучшению их культивирования на питательных средах. Данные методы являются дорогостоящими и более трудоёмкими по сравнению со стандартными методами обработки.

Материал от пациентов с МВ на микобактерии должен исследоваться по отдельному алгоритму, отличному от стандартных схем работы с материалом для выделения микобактерий. После первого этапа процедуры деконтаминации необходимо проводить микроскопическое исследование материала. На основании результатов микроскопического исследования можно сделать заключение о наличии или отсутствии в препарате кислотоустойчивых бактерий,

оценить эффективность деконтаминации в отношении неферментирующих грамотрицательных бактерий и грибов. Второй этап проводится в случае крайне высокой степени загрязнения клинического материала грамотрицательными бактериями, в дополнение к стандартным методикам его необходимо обработать раствором 5% щавелевой кислоты. Только после проведения качественной деконтаминации материал от пациентов с МВ можно брать в дальнейшую работу и проводить посев [34]. Это необходимо учитывать при посеве клинического материала от пациентов с МВ в профильных лабораториях противотуберкулёзной службы, в которых на сегодняшний день преимущественно проводятся исследования на НТМ.

Приведённые выше схемы деконтаминации прописаны и в рекомендациях Американского фонда муковисцидоза (CFF) и Европейского общества по муковисцидозу (ECFS). В некоторых лабораториях в качестве вещества для предварительной обработки клинических образцов может применяться натрий додецилсульфат (лаурит). Этот деконтаминант не подходит для работы с автоматизированными системами обнаружения роста микобактерий, поскольку это приводит к ухудшению культивирования микобактерий и задержке показателя среднего времени обнаружения роста [35].

Предварительную обработку мокроты от пациентов с МВ в большинстве лабораторий всё чаще проводят 1% раствором хлоргексидина. При его применении выделение НТМ увеличивается в 2 раза. Особенно это важно, если учесть, что культивирование НТМ затруднено в связи с присутствием в мокроте *Pseudomonas aeruginosa* и других грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов, наличие которых в респираторном тракте наблюдается более чем у 80% пациентов с МВ. Хлоргексидин может негативно влиять на процессы культивирования в жидких автоматических системах. В этом случае необходимо нейтрализовать его лецитином [34].

Культивирование и идентификация НТМ. В Российской Федерации общепринятым для культивирования как туберкулёзных, так и нетуберкулёзных микобактерий в лабораториях противотуберкулёзной службы является комплекс из трёх сред: Левенштейна–Йенсена, Финн-П и жидких сред для автоматизированных комплексов, которые используются для культивирования посевов клинического материала. Чаще всего в качестве жидкой среды используется среда Миддлбрука в соответствии со стандартными протоколами Приказа Минздрава РФ № 109 от 21 марта 2003 г.

Использование таких сред является приоритетным в связи с основной целью работы противотуберкулёзной службы по выявлению инфицированности микобактериями туберкулёзного комплекса. Культивирование посевов проводится при температуре 37°C. Такие методы не могут быть однозначно экстраполированы и использоваться без дополнений при выделении НТМ. Особенно это касается выделения быстрорастущих НТМ, которые при активном росте могут быть расценены как контаминанты материала сапрофитной микрофлоры. А если учесть, что многие из быстрорастущих НТМ являются слабо кислотоустойчивыми, их можно не выявить при контрольной микроскопии таких проб с использованием окраски по методу Циля–Нильсена. Некоторые из НТМ для роста в искусственных условиях требуют температурных режимов, отличных от 37°C, – в диапазоне 30–42°C [5, 16].

За рубежом всё чаще выделение быстрорастущих НТМ от пациентов с МВ проводят без использования специализированных сред для культивирования микобактерий в обычных микробиологических лабораториях. Описан способ выделения НТМ из мокроты у пациентов с МВ, основанный на посеве материала на среды для селективного выделения *Burk-*

holderia cepacia complex, при культивировании на которых в течение 5–14 дней возможно выделение представителей МАВSC[35–37].

Выделение некоторых НТМ становится возможным в условиях обычных, непрофильных по работе с микобактериями туберкулёзного комплекса, лабораториях. В связи с этим становится актуальным вопрос о методах идентификации НТМ. Если лаборатории противотуберкулёзной службы имеют возможность идентификации основных видов НТМ с использованием рекомендованной ВОЗ тест-системы, основанной на методе ДНК-гибридизации, то в рутинной практике она практически не применяется. Выделенные в средах для культивирования *B. cepacia* complex НТМ должны быть переданы в противотуберкулёзную службу для идентификации.

Данную проблему решает внедрение в работу многих лабораторий масс-спектрометров, работающих по принципу времяпролётной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-ToF). Идентификация достаточно большого количества видов НТМ стала возможна на оборудовании различных производителей. При этом некоторые из них рекомендуют протоколы, которые при условии использования специализированных баз данных позволяют идентифицировать порядка 159 видов НТМ с точностью 94,4%.

Заключение. МВ – заболевание уникальное с точки зрения участия в патологическом процессе разнообразной микрофлоры. Совершенствование идентификации ставит перед микробиологами задачи выделения новых микроорганизмов из клинического материала от пациентов с МВ. Рост выделения НТМ из мокроты у таких пациентов требует оптимизации лабораторной диагностики микобактериозов с учётом специфики, связанной с факторами риска, эпидемиологическими аспектами микобактериозов, особенностями при проведении скрининговых исследований, организации работы с клиническим материалом (в первую очередь его деконтаминацией). Внедрение новых методов идентификации НТМ позволяет работать с некоторыми быстрорастущими микобактериями не только в лабораториях противотуберкулёзной службы, но и в обычных бактериологических лабораториях. Среди таких методов, на наш взгляд, наиболее перспективным является MALDI-ToF масс-спектрометрия, которая позволяет идентифицировать большинство видов НТМ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 4, 6 – 19, 21 – 37
см. REFERENCES)

1. Чучалин А.Г. *Респираторная медицина: в 2 т.* (Т. 1). М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
2. Кондратьева Е.И., Красовский С.А., Воронкова А.Ю., Амелина Е.Л., Черныя А.В., Каширская Н.Ю. *Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации. 2015 год.* М.: «Медпрактика-М»; 2016.
5. Майорова А.А., Степаншина В.Н., Коробова О.В., Шемякин И.Г., Лазовская А.Л., Ильина Е.А. Видовая идентификация микобактерий нетуберкулёзного комплекса методом амплификации и секвенирования генов 16S рРНК. *Журнал молекулярной генетики, микробиологии, вирусологии.* 2004; 3: 11–20.
20. Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Ларионова Е.Е., Андреевская И.Ю., Устинова В.В., Черноусова Л.Н. Мониторинг видовой разнообразия нетуберкулёзных микобактерий в ряде областей РФ с использованием ДНК-стрипов GeoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Германия). *Туберкулез и болезни легких.* 2017; 5: 54–9.

REFERENCES

1. Chuchalin A.G. *Respiratory medicine. [Respiratornaja meditsina].* Moscow: GEOTAR-Media; 2007. (in Russian)
2. Kondrat'eva E.I., Krasovskiy S.A., Voronkova A.Ju., Amelina E.L., Chernyaka A.V., Kashirskaya N.Ju. *The register of patients with cystic fibrosis in the Russian Federation. 2015 [Registr bol'nyh mukoviscidozom v Rossijskoj Federacii. 2015 god.]* Moscow: «Medpraktika-M»; 2016. (in Russian)
3. Nick J.A., Nichols D.P. Diagnosis of Adult Patients with Cystic Fibrosis. *Clin. Chest. Med.* 2016; 37(1): 47–57.
4. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax.* 2016; 71: 1–22.
5. Maiyurova A.A., Stepanshina V.N., Korobova O.V., Shemjakin I.G., Lazovskaya A.L., Il'ina E.A. Specific identification of mycobacteria of a non-tuberculosis complex by amplification and sequencing of 16S rRNA genes. *Zhurnal molekulyarnoy genetiki, mikrobiologii, virusologii.* 2004; 3: 11–20. (in Russian)
6. Thomson R., Tolson C., Carter R., Coulter C., Huygens F., Hagneaves M. Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51: 3006–11.
7. Horsburgh C.R., Korvick J.A., Benson C.A. Epidemiology of Mycobacterium avium complex. Mycobacterium avium complex infection: progress in research and treatment. New York: Marcel Dekker; 1996; 1–22.
8. Olivier K.N., Weber D.J., Wallace R.J., Faiz A.R., Lee J.H., Zhanq Y. et al. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167: 828 – 34.
9. Roux A.L., Catherinot E., Ripoll F., Soismier N., Macheras E., Ravilly S. et al. Jean-Louis Herrmann for the OMA Group. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 9: 117 – 23.
10. Smith M.J., Efthimiou J., Hodson M.E., Batten J.C. Mycobacterial isolations in young adults with cystic fibrosis. *Thorax.* 1984; 39: 369–75.
11. Rodman D.M., Polis J.M., Heltshe S.L., Sontag M.K., Chacon C., Rodman R.V. et al. Late diagnosis defines a unique population of long-term survivors of cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 171: 621–6.
12. Esther C.R., Esserman D.A., Gilligan P. Kerr A., Noone P.G. Chronic Mycobacterium abscessus infection and lung function decline in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* 2010; 9: 117–23.
13. Adjemian J., Olivier K.N., Prevots D.R. Nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in the United States: screening practices and environmental risk. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014; 190: 581–6.
14. Roux A.L., Catherinot E., Ripoll F., Soismier N., Macheras E., Ravilly S. et al. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47: 4124–8.
15. Qvist T., Gillijam M., Jonsson B., Taylor-Robinson D., Jensen-Fangel S., Wanga M. et al. the Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium (SCFSC). Epidemiology of nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in Scandinavia. *J. Cyst. Fibros.* 2014; 14: 1569–1993.
16. Chan E.D., Kaminska A.M., Gill W., Chmura K., Feldman N.E., Bai X. et al. Alpha-1-antitrypsin (AAT) anomalies are associated with lung disease due to rapidly growing mycobacteria and AAT inhibits Mycobacterium abscessus infection of macrophages. *Scand. J. Infect. Dis.* 2007; 39: 690–6.
17. Sakatani M. Nontuberculosis mycobacteriosis: the present status of epidemiology and clinical studies. *Kekkaku.* 1999; 74: 377–84.
18. Levy I., Grisaru-Soen G., Lerner-Geva L., Kerem E., Blau H., Bentur L. et al. Multicenter cross-sectional Study of Nontuberculous Mycobacterial Infections among Cystic Fibrosis patients, Israel. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14: 378–84.
19. Catherinot E., Roux, A.L., Vibet, M.A., Bellis G., Ravilly S., Lem-

- onnier L. et al. OMA Group. Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations. *J. Cyst. Fibros.* 2013; 12: 74–80.
20. Smirnova T.G., Andreevskaja S.N., Larionova E.E., Andrievskaja I.Ju., Ustinova V.V., Chernousova L.N. Monitoring of species diversity of nontuberculous mycobacteria in different areas using Geo-Type Mycobacterium CM / AS DNA strips (Hain Lifescience, Germany). *Tuberkulez i bolezni legkih.* 2017; 5: 54–59. (in Russian)
 21. Aitken M.L., Burke W., McDonald G. Wallis C, Ramsey B, Nolan C. Nontuberculous mycobacterial disease in adult cystic fibrosis patients. *Chest.* 1993; 103: 1096–9.
 22. Chalermkulrat W., Sood N., Neuringer I.P. Hecker T.M., Chang L, Rivera M., Non-tuberculous mycobacteria in end stage cystic fibrosis: implications for lung transplantation. *Thorax.* 2006; 61: 507–13.
 23. Kim J.S, Tanaka N., Newell J.D., Degroote M.A., Fulton K., Huitt G. et al. Nontuberculous mycobacterial infection: CT scan findings, genotype, and treatment responsiveness. *Chest.* 2005; 128: 3863–9.
 24. Esther C.R. Jr., Henry M.M., Molina P.L., Leigh M.W. Nontuberculous mycobacterial infection in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 2005; 40: 39–44.
 25. Evans J.T., Ratnaraja N., Gardiner S. Hawkey P., Smith E.G. Mycobacterium abscessus in cystic fibrosis: what does it all mean? *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17: 602.
 26. Mussaffi H., Rivlin J., Shalit I., Ephros M., Blau H. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and steroid therapy. *Eur. Respir. J.* 2005; 25: 324–8.
 27. Ager S., O'Brien C., Spencer D.A., Robb A. A retrospective review of non-tuberculous mycobacteria in pediatric cystic fibrosis patients at a regional centre. *J. Cyst. Fibros.* 2011; 10: 36.
 28. Renna M., Schaffner C., Brown K., Shang S., Tamayo M.H., Hegyi K. et al. Azithromycin blocks autophagy and may predispose cystic fibrosis patients to mycobacterial infection. *J. Clin. Invest.* 2011; 121: 3554–63.
 29. Binder A.M., Adjemian J., Olivier K.N., Prevots D.R. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections and associated chronic macrolide use among persons with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 188: 807–12.
 30. Griffith D.E., Brown-Eliot B.A. An official ATS IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 175: 367–416.
 31. Pye A., Hili S.L., Bharadwa P. Effect of storage and postage on recovery and quantitation of bacteria in sputum samples. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008; 61: 352. 13.
 32. Mase S.R., Ramsay A. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2007; 11: 485–95.
 33. Stacey L. Martiniano, Jerry A. Nick, Charles L. Daley Nontuberculous Mycobacterial Inf. in Cystic Fibrosis. *Clin. in Chest. Med.* 2016; 37: 83–96.
 34. Ferroni A., Vu-Thien H., Lanotte P, Le Bourgeois M., Sermet-Gaudelus I., Fauroux B. et al. Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 2237–9.
 35. Foweraker J.E., Jalili S., Athithan V., Grogono D., Curran M.C., Floto R.A. New Approaches To The Culture Of Mycobacterium Abscessus Complex From Patients With Cystic Fibrosis. *Thorax* 2015; 70: 180.
 36. Peter H. Gilligan. Infections in Patients with Cystic Fibrosis *Clin. in Lab. Med.*, 2014; 34: 197–217.
 37. Charles R. Esther Jr. Detection of rapidly growing mycobacteria in routine cystic fibrosis cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2011: 1421–5.

Поступила 09.01.18

Принята к печати 16.01.18