

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 И ДИАГНОСТИКА

Том 62

8 • 2017

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

АВГУСТ

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. 8-495-678-64-84

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

Художественный редактор

М. Б. Белякова

Переводчик *В. С. Нечаев*

Корректор *В. С. Смирнова*

Технический редактор *Л. В. Зюкина*

Сдано в набор 24.07.2017.

Подписано в печать 18.08.2017.

Формат 60 × 88¹/₈.

Печать офсетная.

Печ. л. 8,00

Усл. печ. л. 8,33.

Уч.-изд. л. 9,67.

Заказ 751.

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 "Подольская
Периодика", 142110, г. Подольск,
ул. Кирова, 15

Индекс 71442 — для подписчиков

Подписка через Интернет: www.aks.ru,

www.pressa-ru

Подписка на электронную версию:

eibrary.ru

ISSN 0869-2084. Клин. лаб. диагностика.
2017. № 8. 449—512.

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 (*Кишинев*), 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 (*Кишинев*), Е.Н. ОВАНЕСОВ (*Москва*), Ю.В. ПЕРВУШИН (*Ставрополь*), И.В. ПИКАЛОВ (*Новосибирск*), Ю.П. РЕЗНИКОВ (*Москва*), Д.Б. САПРЫГИН (*Москва*), С.Н. СУПЛОТОВ (*Тюмень*), О.А. ТАРАСЕНКО (*Москва*), И.С. ТАРТАКОВСКИЙ (*Москва*), А.Б. УТЕШЕВ (*Алматы*), Л.А. ХОРОВСКАЯ (*Санкт-Петербург*), С.В. ЦВИРЕНКО (*Екатеринбург*), А.Н. ШИБАНОВ (*Москва*), В.Л. ЭМАНУЭЛЬ (*Санкт-Петербург*), Г.А. ЯРОВАЯ (*Москва*)



«Издательство "МЕДИЦИНА"»

ОАО ИЗДАТЕЛ'СТВО
"МЕДИЦИНА"

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

D KLINICHESKAYA LABORATORNAYA diagnostika

Volume 62
8 • 2017

Russian Clinical Laboratory Diagnostics

SCIENTIFIC PRACTICAL MONTHLY JOURNAL

AUGUST

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 *M.B. Belyakova*

Translator *V.S. Nechaev*

Proof-reader *V.S. Smirnova*

Layout editor *L.A. Zyukina*

E-mail: oao-medsina@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 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.

ISSN 0869-2084.

EDITOR BOARD:

Editor-in-Chief V. N. TITOV

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

EDITORIAL COUNCIL:

A.N. ARIPOV (*Tashkent*), T.V. VAVILOVA (*Sankt-Peterburg*), I. WATSON (*Great Britain, Liverpool*), A.Zh. GIL'MANOV (*Ufa*), D.A. GRITCHENKO (*Krasnoyarsk*), V.S. GUDUMAK (*Kishinev*), N.G. DASHKOVA (*Moscow*), V.A. DEEV (*Kiev*), T.I. DOLGIKH (*Omsk*), S.A. ELCHANINOVA (*Barnaul*), A.V. INDUTNY (*Omsk*), V.A. KALLNER (*Sweden, Stockholm*), A.I. KARPITCHENKO (*Sankt-Peterburg*), K.P. KASHKIN (*Moscow*), G.I. KOZINEC (*Moscow*), A.V. KOZLOV (*Sankt-Peterburg*), V.G. KOLB (*Minsk*), G.V. KORSHUNOV (*Saratov*), G.M. KOSTIN (*Minsk*), A.G. KOCHETOV (*Moscow*), N.E. KUSHLINSKII (*Moscow*), G.G. LUNEVA (*Kiev*), A.R. MAVZYTОВ (*Ufa*), V.N. MALACHOV (*Moscow*), D.D. MEN'SHIKOV (*Moscow*), 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*)



ИЗДАТЕЛ'СТВО "МЕДИЦИНА"

БИОХИМИЯ

- Титов В.Н.* Филогенетическая теория общей патологии. Формирование семи биологических функций, семи специфичных, этиологических факторов метаболических пандемий, единого за миллионы лет патогенеза и основ профилактики 452
- Арямкина О.Л., Савоненкова Л.Н., Рузов В.И., Мидленко В.И., Гноевых В.В., Разин В.А., Гамаев Р.Х.* Хронический гепатит при легочном, внелегочном и абдоминальном туберкулезе 462
- Генинг Т.П., Федотова А.Ю., Долгова Д.Р., Абакумова Т.В., Антонева И.И.* Особенности редокс-статуса периферического звена эритрона при различных локализациях неоплазмы органов женской репродуктивной сферы. 468
- Кесслер Ю.В., Иванец Т.Ю., Колодько В.Г.* Референсные интервалы основных параметров мочи для анализаторов SYSMEX UF 1000I/500I в динамике неосложненной беременности 472

ИММУНОЛОГИЯ

- Телесманич Н.Р., Коновальчик М.А., Микашинович З.И.* Анализ уровня общего иммуноглобулина Е (IgE) в сыворотке крови людей с различными типами нарушений углеводного обмена и группами крови 0 (I), А (II), В (III) 476
- Курчевенко С.И., Бодиенкова Г.М.* Донозологическая диагностика вибрационной болезни 482
- Набиева Д.А., Арипов А.Н.* Определение протеомных маркеров и иммунологического профиля и их связь с метаболическими параметрами у больных подагрой 485

ЦИТОЛОГИЯ

- Славнова Е.Н., Тюрин Н.Г., Головин С.Т., Петров А.Н.* Комплексная морфологическая диагностика лимфомы маргинальной зоны 490

МИКРОБИОЛОГИЯ

- Балбуцкая А.А., Дмитренко О.А., Скворцов В.Н.* Современные особенности видовой идентификации коагулазоположительных бактерий рода *Staphylococcus* 497
- Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Гасретова Т.Д., Тюкавкина С.Ю., Сылка О.И., Миронов А.Ю.* Чувствительность к антибиотикам штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных в стационарах Ростова-на-Дону и Ростовской области 502
- Царев В.Н., Подпорин М.С., Ипполитов Е.В.* Применение сканирующей электронной микроскопии и биореактора для оценки эрадикации микробной биопленки корневых каналов при эндодонтическом лечении 506

BIOCHEMISTRY

- Titov V.N.* The phylogenetic theory of general pathology. The development of seven biological functions, seven specific ones and etiological factors of metabolic epidemics, millions years' common pathogenesis and basics of prevention
- Aryamkina O.L., Savonenkova L.N., Ruzov V.I., Midlenko V.I., Gnoevy`kh V.V., Razin V.A., Gamaev R.Kh.* The chronic hepatitis under pulmonary, extra-pulmonary and abdominal tuberculosis
- Gening T.P., Fedotova A.Iu., Dolgova D.R., Abakumova T.V., Antoneeva I.I.* The characteristics of redox-status of peripheral part of erythron under various localizations of neoplasm of organs of female reproductive sphere
- Kessler Yu.V., Ivanets T.Iu., Kolod`ko V.G.* The reference intervals of main parameters of urine for analyzers SYSMEX UF 1000I/500I in dynamics of uncomplicated pregnancy

IMMUNOLOGY

- Telesmanich N.R., Konoval`chik M.A., Mikashinovich Z.I.* The analysis of level of total immunoglobulin E (IgE) in blood serum of patients with various types of disorders of carbohydrate metabolism and blood groups 0 (I), A (II) and B (III)
- Kurchevenko S.I., Bodienkova G.M.* The pre-nosologic diagnostic of vibration disease
- Nabieva D.A., Aripov A.N.* The detection of proteomic markers and immunologic profile and their relationship with metabolic parameters in patients with gout

CYTOLOGY

- Slavnova E.N., Tyurina N.G., Golovin S.T., Petrov A.N.* The complex morphological diagnostic of marginal zone lymphoma

MICROBIOLOGY

- Balbutskaya A.A., Dmitrenko O.A., Skvortsov V.N.* The modern characteristics of species identification of coagulase-positive bacteria of genus *Staphylococcus*
- Kharseeva G.G., Voronina N.A., Gasretova T.D., Tyukavkina S.Yu., Sylka O.I., Mironov A.Yu.* The sensitivity to antibiotics of *Corynebacterium non diphtheriae* isolated in hospitals of Rostov-on-Don and the Rostovskaia oblast
- Tsarev V.N., Podporin M.S., Ippolitov E.V.* The application of scanning electronic microscopy and bio-reactor for evaluating eradication of microbial bio-film of root channels under endodontic treatment

БИОХИМИЯ

© ТИТОВ В.Н., 2017

УДК 616-008.9-092-02

Титов В.Н.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ. ФОРМИРОВАНИЕ СЕМИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ, СЕМИ СПЕЦИФИЧНЫХ, ЭТИОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПАНДЕМИЙ, ЕДИНОГО ЗА МИЛЛИОНЫ ЛЕТ ПАТОГЕНЕЗА И ОСНОВ ПРОФИЛАКТИКИ

ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава РФ, 121552, Москва, Россия

Все отчетливее приходит понимание того, что в общей биологии, в медицине, науке исторической, в биологическом, филогенетическом анамнезе Homo sapiens существует единственная по значимости и пока нерешенная задача: выяснить историческую последовательность становления специфических, этиологических факторов каждой из метаболических пандемий и понять становление единого, миллионы лет формируемого патогенеза всех метаболических пандемий.

Плотоядное питание в океане, травоядное питание предков грызунов и Homo sapiens на суше; злоупотребление травоядного в филогенезе человека последние века плотоядной пищей, нарушение биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии, патология биологических функций адаптации и эндоэкологии, особенности когнитивной биологической функции сформировали этиологические факторы атеросклероза и атероматоза.

Нарушение биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция; несоответствие механизмов регуляции биологической реакции на 2-м и 3-м уровне относительного биологического совершенства in vivo, нарушение биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации сформировали этиологические факторы метаболической артериальной гипертензии.

Синтез в филогенезе жирных кислот (ЖК) на миллионы лет ранее глюкозы, предпочтение клеток поглощать ЖК, а не глюкозу; ранее в филогенезе действие гипергликемии, глюкагона и поздняя функция инсулина сформировали главенство в энергетике организмов метаболизма ЖК и только во вторую очередь — глюкозы.

Формирование в филогенезе методологического приема биологической субординации в действии гуморальных медиаторов, неспособность позднего в филогенезе инсулина блокировать адаптивное действие более ранних в филогенезе гуморальных медиаторов, особенно в висцеральной жировой ткани, формирует этиологические факторы резистентности к инсулину.

Функциональное ограничение когнитивной биологической функции, сложности поддержания единения внутренней среды организма и действия афизиологических факторов внешней среды вызывают необходимость дополнять когнитивную биологическую функцию активацией биологических реакции апоптоза и аутофагии. Это формирует этиологические факторы метаболического синдрома — локальной патологии раннего, висцерального, ограниченного в числе клеток пула инсулиннезависимой висцеральной жировой ткани.

Несогласованности когнитивной же биологической функции, необходимость корректировать ее более эффективной биологической функцией интеллекта, роль инсулина в обеспечении энергией новой биологической функции — функции локомоции, формирование неограниченного по числу клеток позднего в филогенезе пула инсулиннезависимых подкожных адипоцитов, сформировали этиологические факторы ожирения.

Биологическую функцию депонирования ЖК в филогенезе in vivo характеризует этиологическая зависимость: депонирование ЖК происходит в форме неполярных триглицеридов (ТГ), освобождение же в межклеточную среду — только в форме полярных, неэтерифицированных ЖК.

Особенности индукции субстратом, формирование позиционных изоформ ТГ, невозможность гидролизовать их при действии гормонозависимой липазы вынуждают удалять афизиологичные ТГ из печени вместе с гепатоцитами, реализуя биологические реакции апоптоза и аутофагии. Они становятся этиологическими факторами неалкогольной жировой болезни печени; это афизиологичные, позиционные изоформы ТГ как пальмитоил-пальмитол-пальмитат и стеарил-стеарил-стеарат.

Формирование в филогенезе эндогенной гиперурикемии инициировали 2 мутации. Первая — ген аскорбиновой кислоты «минус» лишила Homo sapiens синтеза гидрофильного акцептора активных форм кислорода (АФК). Вторая мутация — ген уриказы «минус» блокировал синтез аллантаина, но дал возможность реабсорбировать мочевую кислоту (МК) из пула первичной мочи и использовать ее in vivo как акцептор АФК вместо аскорбиновой кислоты при реализации биологической функции эндоэкологии, биологической реакции воспаления.

Ключевые слова: атеросклероз; метаболическая артериальная гипертензия; метаболический синдром; резистентность к инсулину; ожирение; неалкогольная жировая болезнь печени и эндогенная гиперурикемия.

Для цитирования: Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Формирование семи биологических функций, семи специфических, этиологических факторов метаболических пандемий, единого за миллионы лет патогенеза и основ профилактики. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (8): 452-462. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-452-462>

Titov V.N.

THE PHYLOGENETIC THEORY OF GENERAL PATHOLOGY. THE DEVELOPMENT OF SEVEN BIOLOGICAL FUNCTIONS, SEVEN SPECIFIC ONES AND ETIOLOGICAL FACTORS OF METABOLIC EPIDEMICS, MILLIONS YEARS' COMMON PATHOGENESIS AND BASICS OF PREVENTION

The Russian cardiologic R&D production complex of Minzdrav of Russia, 121552 Moscow, Russia

The clearer realization is coming that in general biology, medicine, historical science, in biologic phylogenetic anamnesis of Homo sapiens a task exists only one by its significance and unresolved still: to establish historical succession of becoming of specific etiologic factors of every metabolic epidemic and to understand becoming of millions years' common pathogenesis of all metabolic pandemics. The carnivorous feeding by ocean, herbivorous feeding of ancestors of rodents and Homo sapiens by dry land; misusing carnivorous food by phylogenetically herbivorous human during last centuries, disorder of biological function of trophology, biological reaction of exotrophy, pathology of biologic functions of adaptation and endoecology, features of cognitive biological function formed etiologic factors of atherosclerosis and atheromatosis.

The abnormalities of biological reaction metabolism ↔ micro-circulation; discrepancy of mechanisms of regulation of biological reaction at 2d and 3d levels of relative biological perfection in vivo, disorder of biological function of adaptation, biological reaction of compensation formed etiologic factors of metabolic arterial hypertension. The synthesis of fatty acids in phylogenesis millions of years before of glucose, preference of cells to absorb fatty acids instead of glucose; previously in phylogenesis effect of hyperglycemia, glucagon and late function of insulin formed priority of metabolism of fatty acids in energetics of organisms and glucose only in the second instance.

The formation in phylogenesis of methodological mode of biological subordination in functioning of humoral mediators, incapability of insulin late in phylogenesis of blocking adaptive action of humoral mediators earlier in phylogenesis, especially in visceral fatty tissue form etiologic factors of resistance to insulin.

The functional limitation of cognitive biological function, difficulties in maintaining unity of internal medium of organism and effects of aphysiologic factors of external medium produces necessity of completing cognitive biological function with activation of biological reaction of apoptosis and autophagy. This occurrence forms etiologic factors of metabolic syndrome - a local pathology of early, visceral, limited in numbers of cells of pool of insulin-independent visceral fatty tissue.

The inconsistency of cognitive biological function, necessity of correcting it by more effective biological function of intellect, role of insulin in energy support of new biological function - locomotion, formation of unlimited in numbers of cells a pool late in phylogenesis of insulin-dependent subcutaneous adipocytes, formed etiologic factors of obesity.

The biological function of depositing of fatty acids in phylogenesis in vivo is characterized by etiologic dependence: depositing of fatty acids occurs in the form of non-polar triglycerides and releasing into intercellular medium occurs only in form of polar unesterified fatty acids.

The features of induction with substrate, formation of positioning isoforms of fatty acids, impossibility of hydrolyzing them at effecting of hormone-dependent lipase compel to eliminate aphysiologic triglycerides from liver together with hepatocytes implementing biological reactions of apoptosis and autophagy. They become etiologic factors of non-alcoholic fatty disease of liver; these are aphysiologic positioning isoforms of triglycerides as palmitoyl-palmitol-palmitate and stearyl-stearyl-stearate.

The formation of endogenous hyperuricemia in phylogenesis was initiated by 2 mutations. The first one - a gene of ascorbic acid "minus" deprived Homo sapiens of synthesis of hydrophilic acceptor of active forms of oxygen. The second one - a gene of uricase "minus" blocked synthesis of allantoin but provided a possibility of re-absorbing uric acid from a pool of primary urine and use it in vivo as an acceptor of active forms of oxygen instead of ascorbic acid under realization of biological function of endoecology, biologic reaction of inflammation.

Key words: atherosclerosis; metabolic arterial hypertension; metabolic syndrome; insulin resistance; obesity; non-alcoholic fatty disease of liver; endogenous hyperuricemia

For citation: Titov V.N. The phylogenetic theory of general pathology. The development of seven biological functions, seven specific ones and etiologic factors of metabolic epidemics, millions years' common pathogenesis and basics of prevention. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (8): 452-462. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-452-462>*

For correspondence: Titov V.N., doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of clinical biochemistry of lipoproteins. e-mail: vn_titov@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.10.2016
Accepted 29.11.2016

Почти полное отсутствие в отечественной медицине единой системы профилактики метаболических пандемий, неоднозначное по эффективности медикаментозное воздействие при нечетком восприятии специфических, этиологических факторов и единого патогенеза трудно оценивать как что-то значимое в прогностическом отношении. Мы предлагаем на основании разработанной нами филогенетической теории общей патологии [1] раздельно изложить сформировавшиеся на разных ступенях филогенеза специфические этиологические факторы каждой из 7 общепринятых метаболических пандемий.

Этиологический фактор — специфичность физиологич-ных и афизиологичных процессов в биологии и медицине. Нет сомнений в том, что медицина как наука историческая на

протяжении миллионов лет остается неотъемлемой частью общей биологии. Исходя из этого, можно понять стремление исследователей постоянно сближать биологию и медицину в стремлении познать те скрытые стимулы, которые в состоянии помочь нам сохранить здоровье популяции *Homo sapiens*. Вместе с тем мы мало внимания обращаем на различия, которые характеризуют цели, задачи и методологические приемы общей биологии и медицины.

Общая биология реализована в филогенезе на протяжении миллионов лет, она формировала единый анамнез всего живого, включая и вид *Homo sapiens*; на этом фоне длительность онтогенеза отдельных особей — величина несоизмеримо малая. Благотворное действие медицины реализовано всего-то в рамках анамнеза единой особи, в онтогенезе.

В медицине по отношению к *Homo sapiens* мы четко дифференцируем *in vivo* факторы физиологические, афизиологические и патологические. В общей биологии столь четкого функционального деления нет; с позиций общей биологии гибель *in vivo* не только отдельных клеток, но и популяций клеток по типу генетически запрограммированного апоптоза, аутофагии — вынужденно позитивна как в плане нежелательного продолжения патологического процесса, так и в процедуре выздоровления.

При нарушении когнитивной биологической функции, при изменении динамичного единения внутренней (*in vivo*) и внешней среды организма нарушенное позиционирование особи во внешней среде вынуждает организм использовать не только медицинские методологические приемы регуляции, но и не столь гуманные принципы общей биологии. Они включают программируемую гибель клеток по типу апоптоза и даже биологическую реакцию аутофагии [2]; происходит все, естественно, во имя сохранения особи в онтогенезе.

Гибель не только отдельных клеток, но и особей с позиций общей биологии — обычное явление. В общей биологии нет понятий «болезнь», «выздоровление»; биология оперирует только двумя понятиями — «жизнь» и «смерть», не признавая понятия «летальность».

Этиология — причина возникновения болезни, фактор, который определяет специфичность патологического процесса. Среди этиологических факторов патологии человека выделяют механические, физические, химические и биологические, психогенные и генетические. Этиологическими факторами эндогенно формируемых метаболических пандемий являются нарушения когнитивной биологической функции, позиционирования особи с ее индивидуальными особенностями регуляции метаболизма в тесном общении с не всегда благоприятно воздействующими факторами внешней среды. Поскольку среди всех метаболических пандемий наибольший урон пациентам наносят атеросклероз и атероматоз, с них, мы полагаем, нужно и начать обсуждение [3].

Филогенез и этиологические факторы атеросклероза и атероматоза. За миллионы лет жизни первых анаэробных гетеротрофов архей в водах 3 мировых океанов единственным экзогенным субстратом и процессом для наработки энергии одноклеточными и многоклеточными было окисление уксусной кислоты (ацетата) неорганического происхождения, ацетоацетата, С4 кетоновых тел (КТ) и жирных кислот (ЖК), С6—С20. Миллионы лет в глубины океана, где и началось зарождение жизни, свет не проникал, формирование фотосинтезирующих автотрофов (предшественников растений) произошло много позже; миллионы лет глюкозу при жизни архей в океане они не синтезировали; миллионы лет ее вообще не было [4].

Все археи (гетеротрофы) питались вначале ацетатом неорганического происхождения, позже ацетил-КоА животного, океанического происхождения, КТ — С4 ЖК, средне- и длинноцепочечными ЖК. Основным достижением физико-химии и биохимии гетеротрофов архей стало формирование митохондрий; они и по истечению 4 млрд лет высокоэффективно реализуют синтез макроэргического АТФ из активированной уксусной кислоты — из ацетил-КоА. Кинетические параметры функции митохондрий в биологии остаются непревзойденными [5].

Более позднее формирование в океане автотрофов, аэробных организмов. Когда концентрация органических молекул и в поверхностных слоях океана стала биологически значимой, энергия солнца в форме световой энергии инициировала формирование новых одноклеточных, которые, овладев основами фотосинтеза, стали синтезировать необходимые им субстраты для наработки энергии; одновременно автотрофы синтезировали и кислород, постепенно формируя атмосферу Земли. На этом пути образовавшиеся автотрофы, используя физико-химические возможности хлорофилла и энергию солнца в форме квантов света, начали синтезировать глюкозу.

Глюкоза для автотрофов стала универсальным субстратом и обеспечила энергетическую основу всех реакций метаболизма, используя энергию фотосинтеза.

Между началом синтеза ЖК археями и глюкозы автотрофами прошли миллионы лет. Автотрофы не имели митохондрий и возможности столь эффективно, как археи, окислять ацетил-КоА, ЖК и нарабатывать АТФ. Автотрофы тоже начали синтез АТФ, но ограниченно, используя для этого биохимические реакции брожения; с высокоэффективной физико-химической функцией митохондрий биохимические реакции брожения сравнивать трудно. Одновременно автотрофы освоили и биохимические реакции синтеза ЖК из глюкозы. Вероятно, это происходило по пути синтеза ацетил-КоА из глюкозы, далее биологической реакции синтеза насыщенной С16:0 пальмитиновой ЖК (НЖК) в реакции Кноппа—Линена. С годами благодаря совершенству функции автотрофов при синтезе ими глюкозы в атмосфере стал накапливаться O_2 , и условия для жизни анаэробных гетеротрофов архей становились все сложнее.

Митохондрий у автотрофов не было: для наработки энергии они задействовали специфичный пируватдегидрогеназный комплекс в цитоплазме клеток; он реализовал ферментативное декарбоксилирование пирувиноградной кислоты (пирувата) с образованием ацетил-КоА. Биохимический, восстановительный синтез глюкозы из исходных окисленных фрагментов CO_2 и H_2O автотрофы отлаживали и совершенствовали в течение миллионов лет. Можно обоснованно полагать, что создание столь сложной последовательности гармонично сопряженных физико-химических (световых) и биохимических (темновых) процессов фотосинтеза в цикле Кальвина потребовало от автотрофов создания принципиально новой системы регуляции метаболизма, которая основана на функции новых, специализированных регуляторных клеток, нейронов и астроцитов с формированием первичных нейронных сетей. Все потребности в энергии для реализации биохимических, эндотермических физиологических реакций нейроны и астроциты у автотрофов и позже сформированных ПС астроциты + нейроны покрывают за счет метаболизма глюкозы.

Со временем, при росте числа автотрофов и образовании O_2 , побочного продукта синтеза глюкозы из воды и CO_2 , происходило формирование атмосферы Земли; в этих условиях существование анаэробных гетеротрофов архей становилось все более проблематичным. В этих условиях произошло историческое, симбиотическое слияние аэробных автотрофов и анаэробных архей с образованием вначале одноклеточных, а далее и многоклеточных симбионтов. Симбионты и стали прародителями всех животных на планете. Естественно, что в атмосфере кислорода все одноклеточные стали аэробами.

Биологическое слияние автотрофы + археи, использование аэробными симбионтами одновременно двух субстратов наработки энергии. Обоснованно полагать, что в процессе симбиотического эндоситоза более поздние в филогенезе аэробные автотрофы поглотили более ранних анаэробов архей. При этом симбионты аккуратно «приватизировали» все функциональные структуры архей, включая: а) органеллы митохондрий со специфичным, высокоэффективным синтезом макроэргического АТФ [6]; б) геном митохондрий, который и в настоящее время экспрессирует синтез протеинов всех специфичных структур метаболизма вначале экзогенного, а далее синтезированного из глюкозы (из пирувата) ацетил-КоА; в) все системы переноса ЖК в цитоплазме клеток между отдельными органеллами в ассоциации со специфичными липидсвязывающими белками в полярной форме, включая г) функцию специфичных органелл — пероксисом и все исполняемые ими биохимические приемы оптимизации экзогенных ЖК.

В процессе биологического приватизационного слияния при эндоситозе более поздними в филогенезе автотрофами

более ранних архей произошло симбиотическое слияние 2 самостоятельных, совершенных одноклеточных организмов. Формирование их началось с интервалом в миллионы лет и происходило в разных условиях мирового океана. У архей происходило это в анаэробных условиях сложившегося метаболизма, основную роль в котором исполняли митохондрии. У автотрофов при отсутствии митохондрий в биохимических реакциях аэробного метаболизма — гликолиза, функции пируватдегидрогеназного комплекса, синтеза гликогена и реакции гликогенолиза.

И автотрофы, и археи старались при слиянии сохранить все особенности метаболизма, которые они отработали за миллионы лет. Симбионты стали рационально реализовывать свои возможности вначале на уровне одноклеточных, а затем и на уровне многоклеточных организмов, в полной мере используя дуализм реакций метаболизма, которые стали свойственными новым одноклеточным симбионтам.

И каким бы сочетанным и «коллегиальным» не был процесс симбиотического слияния автотрофов и архей, каждый из одноклеточных симбионтов в полной мере сохранил дуализм миллионами лет сформировавшихся процессов метаболизма. При этом реально выражены различия метаболизма симбионтами ЖК и глюкозы: доминирование *in vivo* ЖК при наработке клетками энергии, функции митохондрий и более ограниченная роль глюкозы в биохимических процессах энергообеспечения симбиотических автотрофов даже при функции митохондрий. В полной мере различие обеспечения энергией симбионтов проявилось не на 1-м, аутокринном уровне относительного биологического совершенства, не в самих одноклеточных симбионтах. Более активно это различие выражено на 2-м уровне относительного биологического совершенства, на уровне функциональной дифференцировки клеток, в ПС как структурных и функциональных единицах каждого из органов, далее и систем органов. В полной же мере дуализм регуляции метаболизма, который потенциально заложен на уровне одноклеточных симбионтов, проявился на 3-м уровне относительного биологического совершенства, на уровне организма [7].

Структурные и метаболические последствия in vivo различия автотрофов и архей; реализация на уровне организма. Биологическое, симбиотическое слияние автотрофов и архей без преувеличения можно именовать историческим. Последствия его в течение миллионов лет можно проследить *in vivo* на 3 уровнях относительного биологического совершенства: а) на 1-м, аутокринном, клеточном уровне; б) на 2-м уровне специализированных ПС функционально разных клеток, на уровне структурных и функциональных единиц каждого из органов, систем органов и в) на 3-м уровне относительного биологического совершенства — в организме. Миллионами лет, будучи изначально анаэробными, митохондрии в одноклеточных и многоклеточных организмах симбионтов постепенно адаптировались к аэробным условиям, сохранив высокие кинетические параметры наработки АТФ.

В принципе сложилась компромиссная ситуация: а) все структуры и функциональные системы, которые перешли в симбионты из архей, сохранили обеспечение клеток энергией за счет метаболизма экзогенного ацетил-КоА, а позже и эндогенного ацетил-КоА, образованного в том числе из глюкозы, из пирувата при окислении его в митохондрии; б) все же структуры и функциональные системы, которые ранее принадлежали автотрофам, сохранили обеспечение энергией за счет метаболизма эндогенно синтезированной глюкозы. При этом метаболизм синтезированного в клетках ацетил-КоА стали осуществлять митохондрии. Постепенно все этапы метаболизма субстрата: лактат → пируват → ацетил-КоА → митохондрии → цикл Кребса → реакции дыхательной цепи → синтез АТФ стали у симбионтов аэробными.

В конечном итоге анаэробными реакциями, которые не требуют участия атомарного O₂, у симбионтов остались толь-

ко реакции гликолиза в цитоплазме клеток по пути: глюкоза-6-фосфат → лактат с образованием при этом одной молекулы АТФ. Обратное же превращение лактата (молочную кислоту) в пируват и в глюкозу (реакцию, обратную гликолизу) могут далеко не все клетки; происходит это в цикле Кори. И если археи и автотрофы для обеспечения клеток энергией (АТФ) обходились метаболизмом одного субстрата: археи — только КТ и короткоцепочечными ЖК, а автотрофы — только глюкозой, то симбионты для синтеза АТФ дифференцированно метаболизуют одновременно ЖК и глюкозу. Предпочтение в поглощении клетками из межклеточной среды двух субстратов — ЖК или глюкозы — всегда в пользу ЖК [8].

На 2-м уровне относительного биологического совершенства *in vivo*, на уровне ПС функционально разных клеток, структурных и функциональных единиц каждого из органов, началось формирование функциональных, регуляторных систем, которые состоят главным образом из специализированных регуляторных клеток — нейронов и астроцитов. Предназначены они для реализации филогенетически поздней когнитивной биологической функции для реализации 2 целей: а) единения регуляции метаболизма, скоординированного одновременно на 3 уровнях относительного биологического совершенства *in vivo* (на уровне клеток, в ПС, органах, системах органов и на уровне организма) и б) постоянного, ежеминутного позиционирования, адаптации метаболизма *in vivo* с действием не всегда благоприятных, но всегда действенных (позитивно или негативно) факторов внешней среды.

Мы полагаем, поскольку: а) прародителями всех астроцитов и нейронов, из которых в филогенезе произошло формирование нервной системы, были только автотрофы; б) в желании избежать симбиотического влияния более ранних в филогенезе архей, согласно методологическому приему биологической субординации; в) учитывая, что нервная — это только регуляторная система, в основу которой биологией положена регуляция автотрофами фотосинтеза глюкозы, на ступенях филогенеза *in vivo* произошло структурное ограничение (изоляция) структур нервной системы от иных систем *in vivo*, которые реализуют разные соматические функции, путем формирования гематоэнцефалического барьера — функционально активного барьера клеток эндотелия: астроциты.

Эндогенные инициаторы выстраивания гематоэнцефалического барьера и формирование локального пула спинномозговой жидкости. Это привело к формированию *in vivo* локального пула спинномозговой жидкости с принудительной циркуляцией и специфичными физико-химическими параметрами ликвора; они существенно отличаются от единого пула межклеточной среды *in vivo*. Наиболее схожи параметры пула спинномозговой жидкости и пула первичной мочи в ПС нефронов в почках; мы полагаем, что в филогенезе пула спинномозговой жидкости и функции нефрона как ПС клеток можно обнаружить много общего.

Объем пула спинномозговой жидкости таков, что он окружает все структуры головного и спинного мозга и каждый из нейронов по длине, пока он имеет шванновскую оболочку из специфичных ФЛ — сфингомиелинов. И только сами окончания нейронов находятся в пуле межклеточной среды с эугликемичным или повышенным уровнем глюкозы.

Гематоэнцефалический барьер отделяет локальный пул межклеточной среды с принудительной гидродинамикой, пул спинномозговой жидкости, ликвора, в котором все процессы метаболизма сохранены такими, каковы они были в цитоплазме автотрофов. В силу этого клетки нервной системы покрывают все потребности в энергии за счет метаболизма экзогенной глюкозы, которая поступает из общего пула межклеточной среды *in vivo* и эндогенно синтезирована в клетках пула спинномозговой жидкости *in situ de novo* из ацетил-КоА, возможно, из С4 кетонных тел (КТ); для них гематоэнцефалический барьер свободно проникаем [9].

Несмотря на то, что все структуры головного и спинного

мозга состоят преимущественно из липидов, из производных ЖК, гематоэнцефалический барьер постоянно непроницаем даже для среднецепочечных ЖК. Это дает основание полагать, что клетки все липиды центральной нервной системы (ЦНС) синтезируют из С4 ЖК, из кетоновых тел, концентрация которых в общем пуле межклеточной среды *in vivo* и в пуле спинномозговой жидкости всегда одинакова. Не исключено, что определенную роль в биохимических взаимоотношениях ЖК и глюкозы имеют и С3-альдегиды, в частности метилглиоксаль [10].

Можно полагать, что пул циркулирующих КТ вначале в цитоплазме одноклеточных организмов симбионтов, а позже и в межклеточной среде в составе ацетоацетата, β -гидроксипировата и ацетона *in vivo* стал единственным пулом субстратов, которые свободно преодолевает гематоэнцефалический барьер; он обеспечивает все потребности клеток ЦНС в субстратах для покрытия высоких затрат энергии всеми нейронами, используя в качестве субстрата только глюкозу. Расчеты показали, что нейроны ЦНС потребляют >20% всей экзогенной глюкозы, которая поступает *in vivo* при реализации биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии. И астроциты, и нейроны ЦНС, поглощая КТ из спинномозговой жидкости, используют их как в синтезе ЖК, так же и в процессе синтеза глюкозы, когда в этом возникает острая необходимость.

Активация синтеза гепатоцитами КТ и формирование кетоацидоза служит диагностическим тестом выраженного нарушения метаболизма в клетках ЦНС, которые располагаются в пуле ликвора в рамках гематоэнцефалического барьера. Диабетический кетоацидоз при СД 1-го типа, мы полагаем, специфично высвечивает выраженный дефицит субстрата — глюкозы в спинномозговой жидкости и почти полную остановку синтеза АТФ. Диабетический кетоацидоз — острый дефицит энергии (АТФ) во всех клетках ЦНС, которые произошли от автотрофов. И астроциты (звездчатые клетки), и нейроны синтезируют АТФ из глюкозы по пути: глюкоза → реакции гликолиза → лактат → пируват → ацетил-КоА → митохондрии → цикл Кребса → реакции дыхательной цепи → АТФ [11].

Компенсаторная же регуляция *in vivo* с уровня организма в клетках ЦНС реализована таким образом, как будто необходимо компенсировать дефицит субстратов в тканях, которые являются производными от архей и в качестве субстрата для наработки АТФ используют С4 кетоновые тела. Но в астроцитах и нейронах субстратом синтеза АТФ служит все-таки ацетил-КоА, образованный из глюкозы, а не из КТ. И положения общей биологии о том, что клетки не начнут поглощать из межклеточной среды глюкозу, пока есть возможность поглощать ЖК, никто не отменял. Напомним, что условия для пассивного поглощения клетками глюкозы даже при действии GLUT4 менее благоприятны, чем для активированного поглощения клетками ЖК при действии CD36 транслоказы [12].

Кетоновые тела — пул субстратов синтеза ЖК клетками в локальном пуле спинномозговой жидкости. В еще большей мере нарушение метаболизма глюкозы в нервной ткани утяжеляет компенсаторное повышение синтеза гепатоцитами КТ. Стремясь обеспечить органы ЦНС субстратом, который пригоден для всех локальных пулов межклеточной среды *in vivo*, за исключением пула спинномозговой жидкости, гепатоциты в еще большей мере нарушают поглощение нейронами глюкозы для образования АТФ. Отсутствие в органах ЦНС субстратов для синтеза АТФ формирует выраженный дефицит энергии во всех клетках. Результатом этого становится выраженная гипогликемия (гипогликемия цитоплазмы клеток), гиперкетонемия, метаболический ацидоз и синдром патологической компенсации путем активации респираторного алкалоза (гипервентиляции) с развитием гипогликемического коматозного состояния, выраженной гипоксии при полном

отсутствии образования АТФ и дыхания типа Кусмауля. Повышение давления спинномозговой жидкости вносит вклад в трагический финал критического состояния, инициируя протрузию продолговатого мозга в заднее черепное отверстие с нарушением функции дыхательного центра, выраженной гипоксией и остановкой дыхания.

В критической ситуации ацидотической комы, когда *in vivo* нет субстрата для синтеза АТФ, интуитивно у автора как эндокринолога-хирурга появляется желание инъецировать в вену в комплексе оптимальное количество ацетил-КоА. Это позволит: а) ацетил-КоА быстро достичь клеток ЦНС по пути: пул внутрисосудистой среды → пул ликвора → плазматическая мембрана астроцита и нейрона → цитоплазма → митохондрии → цикл Кребса → физико-химические реакции дыхательной цепи → наработать оптимальное количество АТФ и прервать летальную последовательность событий. Предварительное, *a priori* осмысление процесса не находит препятствий на пути продвижения *in vivo* экзогенного ацетил-КоА; вот если бы так было и после клинического применения — *a posteriori*. Вместе с тем трудно сказать, какая доза ацетил-КоА будет оптимальной и какова может быть стоимость такого лечебного препарата, а главное — сколь клинически эффективной окажется эта процедура. Идея же интуитивно диктует свое; она всегда первична. Первичен в афизиологических процессах *in vivo* феномен недостатка энергии и развивается он, мы полагаем, существенно чаще, чем в клинике это привлекает наше внимание.

Перенос экзогенных ЖК в ЛПВП только у плотоядных животных. При жизни в глубинах морского океана все животные были гетеротрофами; все необходимые для жизни субстраты они получали извне, в первую очередь в форме ЖК. В течение миллионов лет ЖК для архей были экзогенными и все одноклеточные животные (а позже и многоклеточные) были плотоядными; миллионы лет водорослей в океане тоже не было. В наследство от столь древнего (раннего) периода филогенеза в глубинах океана нам досталось то, что и в настоящее время все млекопитающие, как плотоядные (*Carnivore*), так и травоядные (*Herbivore*) сразу после рождения кормят новорожденных плотоядной, животной пищей, молоком матери. В результате самоорганизации функционально разных клеток *in vivo* и формирования специализированных паракринно регулируемых сообществ (ПС) клеток — структурных и функциональных единиц каждого органа и систем органов произошло формирование, в частности, ПС энтероцитов.

Каждое ПС *in vivo* состоит из 3 пулов функционально разных клеток: 1) энтероциты — всасывают (биологическая реакция экзотрофии) из содержимого кишечника необходимые для жизни субстраты — ЖК, глюкозу и протеины, витамины и микроэлементы; 2) клетки локального перистальтического насоса — бислой эндотелий + гладкомышечные клетки — артериола мышечного типа дистального отдела филогенетически раннего артериального русла; он осуществляет перфузию всех клеток ПС, формируя пул межклеточной среды и 3) пул камбиальных клеток рыхлой соединительной ткани (РСТ), которые реализуют несколько биологических функций: депонируют субстраты, реализуют биологическую функцию эндозологии — чистоту межклеточной среды *in vivo*, функцию адаптации, когнитивную биологическую функцию на уровне ПС и органов.

При формировании ПС, структурных и функциональных единиц органов, на 2-м уровне относительного биологического совершенства произошло образование пула межклеточной среды. В нем поглощенные энтероцитами ЖК в биологической реакции экзоцитоза в форме полярных липидов ко всем клеткам стали переносить апоА-I липопротеины высокой плотности (ЛПВП) [13]; иных не было. ЛПВП слабо связывали гидрофобные липиды; содержание ЖК в ЛПВП в форме только полярных липидов (фосфолипидов и диглицеридов) и сейчас *in vivo* низко [14].

Липидами, мы полагаем, являются все ЖК и все соединения, в состав которых ЖК входят. В океане у животных доминировал плотоядный тип питания; началом биологической функции трофологии стала биологическая реакция экзотрофии. Миллионы лет в водах 3 последовательных океанов все животные потребляли только животную пищу, экзогенный ацетат, С4 кетоновые тела, позже более длинными, средне- (С10—С14) и длинноцепочечными (С16—С22) ЖК. Будучи гетеротрофами, археи метаболизировали те ЖК, которые поглощали извне, синтезируя из них более длинные эндогенные ЖК. Из этих ЖК они формировали клеточную мембрану и внутриклеточные органеллы [15].

Энтероциты синтезировали апоА-I; апо связывал ЖК в форме полярных липидов, формируя ЛПВП; синтез глюкозы археи так и не освоили. Все клетки поглощали ЖК из ЛПВП только пассивно; произошло это путем реакции переэтерификации ЖК между ФЛ в ЛПВП и ФЛ наружного монослоя плазматической мембраны клеток. Далее ЛПВП поглощали клетки РСТ в каждом из ПС, реализуя биологические функции гомеостаза и эндоэкологии. Со временем пассивного переноса ЖК в составе ЛПВП без возможности их депонировать стало явно недостаточно. И ПС энтероцитов стали депонировать ЖК, в первую очередь С16:0 пальмитиновую НЖК и мононенасыщенную (МЖК) ω -9 С18:1 олеиновую ЖК с одной двойной связью (ДС) в форме неполярных триглицеридов (ТГ) в канальцах эндоплазматического ретикула энтероцитов.

Ничего хорошего из этого не получилось; функция энтероцитов многообразна, необходимо всасывать многие ингредиенты с разными по физико-химическим свойствам параметрам. Да и ТГ много легче в клетке депонировать, чем потом из клеток освободить, ЖК извлечь. Депонировать ТГ можно в форме неполярных ТГ (*brutto*), освободить же из клетки можно только «поштучно» (*netto*) в форме неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК). Формирование ТГ в энтероцитах происходит в канальцах эндоплазматического ретикула при действии микросомального белка, переносящего триглицериды (МБПТ).

Биохимические сложности регуляции освобождения депонированных ТГ в форме полярных НЭЖК служат причиной: а) накопления в клетках избытка ТГ, ведущего к липоидозу; б) формирования афизиологического состояния эндоплазматического стресса [16] и в результате в) гибели энтероцитов по типу биологически запрограммированного апоптоза и биологической реакции аутофагии (самоуничтожения). Да и энтероциты, как функционально специализированные клетки, для реализации функции депонирования ЖК как субстратов не оптимальны. Депонирование в ПС — удел пула многофункциональных клеток РСТ, которые могут быть специализированы, и для депонирования выражено гидрофобного субстрата — ЖК в форме неполярных ТГ [17].

Микросомальный белок, переносящий триглицериды, эндоплазматический ретикулум, хиломикроны, формирование in vivo системы лимфотока. Каким же образом при отсутствии в ПС апо, которые могут связать и перенести гидрофобные, сформированные в энтероцитах ТГ через гидрофильную межклеточную среду в клетки РСТ, могут стать специализированными клетками для депонирования ЖК в форме ТГ, т. е. жировыми клетками. Эта биологическая реакция была все-таки реализована; произошло это путем соединения в рамках одного ПС канальцев эндоплазматической сети энтероцитов с такими же канальцами клеток РСТ. РСТ в результате стали функционально специализированными жировыми клетками; постепенно это происходило в каждом ПС *in vivo*. Соединение канальцев эндоплазматической сети из разных клеток позволило перенести между клетками ЖК в форме гидрофобных ТГ в составе первичных хиломикронов (ХМ), в полной мере минуя гидрофильную межклеточную

среду. Первичные ХМ в канальцах эндоплазматического ретикула энтероцитов формируют МБПТ [18].

Перенос первичных ХМ, сформированных в энтероцитах происходит, по сути, во внутриклеточных условиях; на этих ступенях филогенеза адекватной замены лимфотоку так и не создано. Сформированная первично система для переноса ЖК в форме ТГ в составе ХМ в рамках ПС энтероцитов, далее, в процессе функционального совершенствования *in vivo*, постепенно превратилась в систему лимфотока *in vivo* [19]. Со временем система стала переносить не только гидрофобные субстраты, но и клетки системы врожденного и приобретенного иммунитета, а также реализовать и иные биологические функции, которые реализует гетерогенный пул РСТ в каждом ПС, в органах и системе органов.

Когда первичные ХМ изливаются в большой круг кровообращения, с ними происходит связывание апоВ-48 и апоЕ; синтезируют их уже гепатоциты [20, 21]. Так, мы полагаем, сформировался конечный этап переноса экзогенных ЖК у всех плотоядных животных. Во внутрисосудистом пуле межклеточной среды плотоядные животные формируют вторичные апоЕ/В-48 ХМ; все их активно поглощают только гепатоциты и, вероятно, трофобласты плаценты путем апоЕ/В-48 эндоцитоза. Более подробно описание функции лимфотока, изначально сформированной для переноса через гидрофильную межклеточную среду экзогенных ЖК в форме ТГ в составе ХМ, а также происхождения гидродинамического усилия и энергии, которая инициирует поток лимфы, и функционального взаимодействия лимфатической системы с системой кровообращения, с кровотоком в венах, приведено ранее [22].

У плотоядных животных за миллионы лет жизни в океане сформировался отдельный перенос к клеткам ЖК: в составе апоА-I ЛПВП и в составе ХМ. И апоА-I, и МБПТ синтезируют энтероциты; апоВ-48 и апоЕ синтезируются уже гепатоцитами. Основную массу экзогенных НЖК + МЖК (более 80% всех ЖК) к клеткам переносят ХМ; меньшее количество ненасыщенных ЖК с 2—3 ДС (ННЖК) и полиеновых ЖК с 4—6 ДС (ПНЖК) переносят к клеткам ЛПВП. Когда пассивного переноса ННЖК + ПНЖК в ЛПВП на ступенях филогенеза стало явно недостаточно, клетки сформировали более производительный апоЕ/А-I активный, рецепторный эндоцитоз ЛПВП клетками *in vivo*.

Можно заключить, что в крови плотоядных животных *in vivo*: а) основную массу экзогенных НЖК + МЖК в форме ТГ переносят ХМ; б) меньшее количество ННЖК + ПНЖК переносят ЛПВП; в) в сыворотке крови содержание α -ЛП всегда выше, чем β -ЛП; г) перенос экзогенных ЖК происходит от энтероцитов и д) основной переносимой, метаболизируемой *in vivo* ЖК служит животная пальмитиновая С16:0 НЖК [23].

Формирование на суше травоядных животных; перенос in vivo эндогенно синтезированной гепатоцитами олеиновой МЖК из глюкозы. После того как океан отступил, многие плотоядные животные оказались на суше; плотоядной (морской, рыбной) пищи на суше мало, но травы и деревья достаточны. И все-таки большинство не по своей воле оказавшихся на суше животных вымерли при отсутствии плотоядной пищи. Оставшиеся животные вымерли от патологии сердечно-сосудистой системы, от атеросклероза, атероматоза, от ишемической болезни сердца. В отличие от сине-зеленых и красных водорослей в океане растения на суше не синтезировали ни ω -3 С20:5 эйкозапентаеновую (эйкоза), ни ω -3 С22:6 докозагексаеновую (докоза) ПНЖК; не синтезируют растения на суше и ω -6 С20:4 арахидоновую (арахи) ПНЖК [24].

Животные на суше не имеют возможности получать с пищей ПНЖК — экзогенные субстраты для синтеза биологически активных гуморальных медиаторов — простаглиннов, простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов и всего класса аминокислотных фосфолипидов. В наружном монослое плазма-

тической мембраны из гидрофобных фосфатидилхолинов аминокислоты образуют менее гидрофобное микроокружение для каждого интегрального белка, обеспечивая его функциональную активность. Во внутреннем монослое клеточной мембраны аминокислоты всегда больше, чем в наружном.

С этого момента начался период в сотни миллионов лет — приспособления к питанию изначально плотоядных животных иной, растительной пищей. Это повлекло за собой столетиями выраженные анатомические изменения организма: биологической функции трофологии; гомеостаза; эндоэкологии, адаптации, локомоции и когнитивной биологической функции [25].

В результате изменения характера питания, прекращения поступления с пищей большого количества экзогенных ЖК: а) ЛПВП, ХМ и перенос ЖК от энтероцитов ко всем клеткам отступили на 2-й план; б) ЛПВП, α -ЛП и ХМ — остались только как атрибуты плотоядного питания. Энтероциты перестали быть отправной точкой переноса ЖК ко всем клеткам; к тому же среди ЖК перестала доминировать С16:0 животная пальмитиновая НЖК. Одновременно *in vivo* у травоядных животных она стала проявлять явно не физиологические свойства [26, 27]. У травоядных животных *in vivo* стала доминировать растительная ω -9 С18:1 олеиновая МЖК.

Плотоядные и травоядные особи на суше не одинаково преодолевают сложные этапы обеспечения *in vivo* реакций метаболизма. И если плотоядные животные, потребляя с пищей много ЖК, решают сложности синтеза из них, из ацетил-КоА оптимального количества глюкозы, то травоядные животные решают иную задачу — как из экзогенной глюкозы синтезировать количество олеиновой МЖК, которое достаточно для оптимальных потребностей клеток в ЖК. И если при плотоядном питании местом, от которого происходил центральный перенос ЖК ко всем клеткам *in vivo*, были энтероциты, у травоядных животных отправной точкой переноса ЖК, синтезированных *in situ de novo*, стали уже гепатоциты.

Это привело к тому, что все системы, которые ранее от энтероцитов переносили все ЖК, утратили ведущую роль; на 1-е место вышел перенос ЖК от печени ко всем клеткам *in vivo*. У травоядных животных и у *Homo sapiens* перенос МЖК + НЖК от гепатоцитов к клеткам стал проходить в составе иных ЛП — в апоВ-100 ЛП низкой плотности (ЛПНП). Все клетки при этом поглощают преимущественно МЖК в форме неполярных ТГ в составе ЛПНП путем апоВ-100-эндоцитоза. Последним *in vivo* сформировался векторный, направленный перенос преимущественно МЖК + НЖК от гепатоцитов к инсулинозависимым клеткам в составе ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП) [28, 29].

Формирование ранних в филогенезе клеток, нечувствительных к инсулину, и поздних в филогенезе инсулинозависимых клеток. К инсулинозависимым клеткам *in vivo* обоснованно отнести: 1) скелетные поперечнополосатые миоциты; 2) синцитий кардиомиоцитов; 3) адипоциты подкожной жировой ткани; 4) перипортальные гепатоциты и 5) поздние в филогенезе высоко специализированные оседлые (резидентные) макрофаги в печени — клетки Купфера [30].

Инсулинонезависимы висцеральные жировые клетки сальника, все нейроны и астроциты, монослой эндотелия большого и малого круга кровообращения, клетки хрусталика глаза. Они не синтезируют рецепторы к инсулину и на плазматическую мембрану не выставляют. Поглощение глюкозы нейронами и астроцитами из пула спинномозговой жидкости происходит только по градиенту концентрации ликвор → цитоплазма в зависимости от выраженности гликопении в клетке. К тому же рано сформированный гематоэнцефалический барьер в филогенезе для позднего инсулина оказывается непроницаемым. И если даже методами иммуохимии удается идентифицировать на мембране астроцитов и нейронов «ре-

цепторы к инсулину», они, как правило, функционально оказываются неактивными.

Все инсулинозависимые клетки *in vivo* стали поглощать ЛПОНП путем апоЕ/В-100-эндоцитоза. В результате: а) миллионы лет анатомической перестройки системы пищеварения; б) изменения биологической функции трофологии; в) биологической реакции экзотрофии; г) доминирования среди ЖК олеиновой растительной МЖК взамен пальмитиновой НЖК животного происхождения — привело к формированию на суше большой популяции видов травоядных животных. У них система переноса экзогенных ЖК от энтероцитов в составе ЛПВП и ХМ фактически утратила функциональное значение, только номинально сохраняя их функцию [31].

При длительном щелочном гидролизе в длинном тонком кишечнике, гидролизе полимеров углеводов (крахмала) и дисахаридов, энтероциты специфично всасывают моносахарид глюкозы и меньшее количество фруктозы, перенося их в потоке крови к гепатоцитам. Поглощение перипортальными гепатоцитами глюкозы происходит при действии инсулина, при выставлении на плазматическую мембрану большого числа инсулинозависимых ГЛЮТ4. Далее при действии глюкокиназы и молекулярного O_2 гепатоциты образуют глюкозо-6-фосфат; из него гепатоциты синтезируют гликоген и запасают его в цитоплазме. Это — адаптивный запас глюкозы для реализации биологических функций гомеостаза и адаптации.

Если эугликемический уровень глюкозы в крови и едином пуле межклеточной среды будет снижен, последует: а) активация ГЛЮТ2 на плазматической мембране α -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы; б) синтез и секреция гуморального медиатора глюкагона; в) активация гликогенолиза в биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации и г) нормализация биологической функции гомеостаза. В форме гидрофильного гликогена в цитоплазме перипортальных гепатоцитов, скелетных и кардиомиоцитов удается депонировать лишь небольшое количество глюкозы. Из всей оставшейся глюкозы гепатоциты синтезируют в цикле Кноппа—Линена без освобождения промежуточных продуктов С16:0 пальмитиновую НЖК; этот синтез реализуют все плотоядные животные в океане и на суше.

Все плотоядные животные основную массу экзогенной пальмитиновой, животной НЖК этерифицируют в состав пальмитиновых ТГ и запасают в висцеральных жировых клетках сальника. Все плотоядные животные физиологично реализуют пальмитиновый вариант метаболизма *in vivo* ЖК [32].

Гепатоциты всех травоядных животных основную массу экзогенной глюкозы используют в синтезе олеиновой МЖК; этерифицируют ее в олеиновые ТГ, включают в состав олеиновых ЛПОНП. Их быстро поглощают инсулинозависимые адипоциты в подкожной жировой ткани. Травоядные животные физиологично реализуют наиболее оптимальный, наиболее эффективный олеиновый вариант метаболизма *in vivo* ЖК.

Различия синтеза гепатоцитами ЖК у плотоядных и травоядных; роль инсулина в формировании травоядных животных. Каким же образом поздний в филогенезе гуморальный медиатор инсулин становится решающим фактором общей биологии, превращаясь миллионами лет плотоядных животных в травоядные? До синтеза инсулина все клетки *in vivo* из экзогенной глюкозы синтезировали только пальмитиновую НЖК; происходило это при действии синтазы ЖК — системы Кноппа—Линена, и все клетки плотоядных реализовали пальмитиновый вариант метаболизма ЖК. При действии *in vivo* инсулина инсулинозависимые клетки синтезируют из глюкозы, как и плотоядные животные, пальмитиновую НЖК, но тут же удлиняют ее на 2 атома углерода и вводят в цепь атомов углерода 1 ДС. Это превращает С16:0 пальмитиновую НЖК в ω -9 С18:1 олеиновую МЖК; все клетки травоядных реализуют только олеиновый вариант метаболизма ЖК. Олеиновую НЖК и олеиновые ТГ, вклю-

чая оливковое и подсолнечное масло, синтезируют все клетки растений; в пальмовом масле доминируют растительные олеиновые ТГ.

Гормон в инсулинозависимых клетках экспрессирует 2 сопряженных фермента: пальмитоил-КоА-элонгазу и стеарил-КоА-десатуразу [33]. Пальмитоил-КоА-элонгаза активирует превращение лишь эндогенно синтезированной С16: 0 пальмитиновой НЖК в С18: 0 стеариновую НЖК. В сопряженной биохимической реакции стеарил-КоА-десатураза тут же превращает стеариновую НЖК в ω -9 С18: 1 олеиновую МЖК [34]. Проведенные нами много лет назад эксперименты *in vitro* при автоматическом титровании индивидуальных ЖК озонем (O_3) показали [35, 36], что константа окисления олеиновой МЖК существенно выше, чем пальмитиновой НЖК. Из этого можно заключить, что при окислении растительной олеиновой МЖК *in vivo* эффективность наработки митохондриями АТФ может быть в несколько раз выше, чем при окислении животной пальмитиновой НЖК. Таким образом, в травоядном организме основным субстратом, который окисляют митохондрии с более высокой эффективностью, синтезируя большее число АТФ в единицу времени, становится олеиновая МЖК.

Гепатоциты всех плотоядных животных используют из-лишки экзогенной глюкозы в синтезе пальмитиновой НЖК. Биологическое предназначение филогенетически позднего гуморального медиатора инсулина, мы полагаем, состоит в реализации биологической функции адаптации, жизни плотоядных животных на суше и превращении на ступенях филогенеза первично плотоядных животных из океана в травоядные виды при жизни на суше. Для этого гепатоциты травоядных животных из экзогенной глюкозы на суше синтезируют вместо наиболее распространенной у плотоядных пальмитиновой НЖК, иную ЖК, которая доминирует в растительном мире и у травоядных животных; это олеиновая МЖК. И если миллионы лет в филогенезе все животные до синтеза ими инсулина были плотоядными, то при действии инсулина они медленно на ступенях филогенеза стали травоядными.

Превращение плотоядных животных в травоядные завершилось, когда гепатоциты травоядных животных из экзогенной глюкозы стали синтезировать такие ТГ, молекулы которых содержали 2 олеиновые МЖК и 1 пальмитиновую НЖК. При этом образуются позиционные изоформы ТГ как олеил-олеил-пальмитат (ООП) и пальмитоил-олеил-олеат (ПОО). С позиций кинетических параметров гидролиза ТГ при действии липаз наиболее активны позиционные изоформы ТГ как олеил-олеил-олеат (ООО) [37]. Такие (олеиновые ТГ, олеиновая МЖК — в позиции sn-2 трехатомного спирта глицерина) ЛПОНП быстро переносят в крови и олеиновые ЛПОНП после формирования лиганда, быстро поглощают инсулинозависимые клетки путем апоЕ/В-100-эндоцитоза [38]. При этом в сыворотке крови натошак физиологичным остается содержание ТГ (точнее спирта глицерина), спирта ХС и ХС-ЛПНП.

Когда филогенетически травоядный *Homo sapiens* злоупотребляет животной пищей и в гепатоцитах велико содержание экзогенной пальмитиновой НЖК из животной пищи, гепатоциты начинают синтез пальмитиновых ТГ, молекулы которых содержат 2 пальмитиновых НЖК и 1 олеиновую МЖК с образованием пальмитиновых ТГ как пальмитоил-пальмитоил-олеат (ППО), олеил-пальмитоил-пальмитат и особо нежелательно — пальмитоил пальмитоил-пальмитат (ППП) [39]. Пальмитиновые ТГ, ЛПОНП травоядных животных физиологично переносить не могут; пальмитиновые ЛПОНП не формируют лиганд и их не поглощают инсулинозависимые клетки путем апоЕ/В-100-эндоцитоза. Заметим, что и олеиновые ЛПОНП физиологично в ЛПНП не превращаются. ЛПНП формируют только пальмитиновые ЛПОНП; они же определяют и величину ХС-ЛПНП. В сыворотке крови увеличивается накопление ТГ, ХС, ХС-ЛПНП, развивается гипертриглицеридемия; за этим последует атероматоз ин-

тимы артерий эластического типа, формирование бляшек и клинической картины ишемической болезни сердца [40, 41].

Выраженное различие кинетических параметров олеиновых и пальмитиновых ТГ служит основой того, что сформированная травоядными животными система ЛПОНП предназначена (по параметрам кинетики) только для переноса олеиновых ТГ, в которых обязательно содержатся 2 молекулы олеиновой МЖК. И если синтезированные гепатоцитами ТГ содержат 2 пальмитиновые НЖК, перенос пальмитиновых ТГ в составе ЛПОНП и далее ЛПНП оказывается невозможным. И вся патология ЖК у травоядных животных сосредоточена только на переносе пальмитиновых ТГ в составе ЛПОНП и поглощении их клетками. Именно на уровне пальмитиновых ЛПОНП расположена *locus minoris resistentia*, ключевое нарушение в развитии атеросклероза и атероматоза.

С позиций филогенетической теории патологии и всех биологических функций, травоядный в филогенезе человек не должен (физиологично не может) злоупотреблять плотоядной мясной и молочной животной пищей. В ней всегда количество пальмитиновой НЖК выше, чем содержание олеиновой МЖК и доминирует пальмитиновая НЖК [42, 43]. Одновременно ЛПОНП травоядных животных, согласно кинетическим параметрам биохимических реакции, не могут переносить, а клетки поглощать пальмитиновые ТГ. Система ЛПОНП сформирована травоядными только для переноса и поглощения инсулинозависимыми клетками физиологичных олеиновых ТГ, перенос пальмитиновых ТГ и поглощение клетками оказывается невозможным. Это определено и различием кинетических параметров гидролиза пальмитиновых и олеиновых ТГ в одноименных ЛПОНП при действии в крови постгепариновой липопротеинлипазы [44].

Поедание травоядным человеком избыточного количества животной пищи — основной этиологический фактор атеросклероза. Развитие ГЛП, формирование в клетках дефицита гуморальных медиаторов — ПНЖК (эйкоза, докоза и арахид) — основа нарушения многих сторон метаболизма на трех уровнях относительного биологического совершенства: аутокринно в клетках, на уровне ПС, органов и систем органов и на уровне организма.

Первой, менее значимой причиной дефицита во всех клетках *in vivo* ПНЖК служит алиментарный дефицит в пище при доминировании плотоядной, мясной, молочной, тоже животной, жирной пищи и пренебрежительное отношение к мюрепродуктам.

Второй причиной дефицита в клетках ПНЖК становится то, что большое количество образованных и секретированных гепатоцитами в кровоток пальмитиновых ЛПОНП инициирует низкую биодоступность ПНЖК в форме линолевых и линоленовых ТГ в составе одноименных ЛПНП. Клетки не могут поглощать их всеми клетками *in vivo* путем апоВ-100-эндоцитоза. Что такое ХС-ЛПНП? Это количество ПНЖК в сыворотке крови в форме эфиров со спиртом ХС в составе ЛПНП, которые не могут поглотить клетки путем апоВ-100-эндоцитоза. Чем выше ХС-ЛПНП, тем больше в ЛП крови содержание ПНЖК, которых столь остро недостает в клетках для регуляции физиологичного метаболизма.

Именно высокое содержание в пище травоядных животных экзогенной пальмитиновой НЖК — причина синдрома резистентности к инсулину (синдрома ИР) [45, 46]. Развивается синдром ИР и при блокаде физиологичного действия инсулина: а) при высоком содержании в плазме крови полярных НЭЖК; и б) липолитическом действии гуморальных медиаторов (тиреоидные гормоны, катехоламины, глюкокортикоиды, соматотропный гормон), действие которых в висцеральных жировых клетках сальника не может блокировать поздний в филогенезе инсулин.

Далее кратко изложены наши представления об этиологических факторах формирования всех метаболических пандемий в популяции *Homo sapiens*. Каждый из этиоло-

гических факторов реализован на разных уровнях относительного биологического совершенства *in vivo*, обладает высокой степенью специфичности и эффективности при реализации в системе профилактики в популяции человека. Каждый из этиологических факторов, кроме атеросклероза и атероматоза, нуждается в более широком обсуждении, но уже в рамках иных статей. Единый алгоритм патогенеза тоже требует детального обсуждения, особенно в свете формирования программы эффективной профилактики. Только в понимании специфичности этиологических факторов, познании единого патогенеза и формировании эффективных программ профилактики заключено все будущее медицинской науки, медицинской практики и здоровье наших соотечественников.

Заключение. В настоящее время все отчетливее приходит понимание того, что в общей биологии, в медицине, в биологическом, филогенетическом анамнезе *Homo sapiens* существует единственная по значимости и пока нерешенная задача: выяснить историческую последовательность становления специфичных, этиологических факторов каждой из метаболических пандемий и понять становление единого, миллионы лет формирующегося патогенеза всех метаболических пандемий.

Плотоядное питание в океане; травоядное питание предков грызунов и *Homo sapiens* на суше; злоупотребление травоядного в филогенезе человека последние века плотоядной пищей, нарушение биологической функции трофологии, биологической реакции экзотрофии, патология биологических функций адаптации и эндозологии, особенности когнитивной биологической функции сформировали этиологические факторы атеросклероза и атероматоза, [47].

Нарушение биологической реакции метаболизм ↔ микроциркуляция; несоответствие механизмов регуляции биологической реакции на 2-м и 3-м уровне относительного биологического совершенства *in vivo*, нарушение биологической функции адаптации, биологической реакции компенсации сформировали этиологические факторы метаболической артериальной гипертензии.

Синтез в филогенезе ЖК на миллионы лет ранее глюкозы, предпочтение клеток поглощать ЖК, а не глюкозу; раннее в филогенезе действие гипергликемии, глюкогона и поздняя функция инсулина сформировали главенство в энергетике организмов метаболизма ЖК и только затем — глюкозы.

Формирование в филогенезе методологического приема биологической субординации в действии гуморальных медиаторов, неспособность позднего в филогенезе инсулина блокировать адаптивное действие более ранних в филогенезе гуморальных медиаторов, особенно в висцеральной жировой ткани, формирует этиологические факторы ИР.

Функциональное ограничение когнитивной биологической функции, сложности поддержания единения внутренней среды организма и действия афизиологичных факторов внешней среды, вызывают биологическую необходимость дополнять когнитивную биологическую функцию активацией биологических реакций апоптоза и аутофагии. Это формирует этиологические факторы метаболического синдрома — локальной патологии раннего, висцерального, ограниченного по числу клеток пула инсулиннезависимой висцеральной жировой ткани.

Несогласованности когнитивной же биологической функции, необходимость корректировать ее более эффективной биологической функцией интеллекта, роль инсулина в обеспечении энергией новой биологической функции — функции локомоции, формирование неограниченного по числу клеток, позднего в филогенезе пула инсулинозависимых подкожных адипоцитов сформировали этиологические факторы ожирения.

Биологическую функцию депонирования ЖК в филогенезе *in vivo* характеризует этиологическая зависимость: депонирование ЖК происходит в форме неполярных ТГ, освобождение же в межклеточную среду — только в форме полярных, неэтерифицированных ЖК.

Особенности индукции субстратом, формирование позиционных изоформ ТГ, невозможность гидролизовать их при действии гормонозависимой липазы вынуждает удалять афизиологичные ТГ из печени вместе с гепатоцитами, реализуя биологические реакции апоптоза и аутофагии. Они становятся этиологическими факторами неалкогольной жировой болезни печени; это такие афизиологичные, позиционные изоформы ТГ, как пальмитоил-пальмитол-пальмитат и стеарил-стеарил-стеарат.

Формирование в филогенезе эндогенной гиперурикемии инициировали 2 мутации. Первая — ген аскорбиновой кислоты «минус» лишила *Homo sapiens* синтеза гидрофильного акцептора активных форм кислорода. Вторая мутация — ген уриказы «минус» блокировала синтез аллантаина, но дала возможность реабсорбировать мочевую кислоту из пула первичной мочи и использовать ее *in vivo* как акцептор АФК вместо аскорбиновой кислоты при реализации биологической функции эндозологии [48, 49], биологической реакции воспаления.

Мы располагаем реальными возможностями сформировать и начать реализацию эффективной программы профилактики атеросклероза, коронарного атероматоза и инфаркта миокарда в надежде на когнитивный, интеллектуальный посыл и со стороны пациентов. Односторонние отношения врач → пациент всегда будут неэффективными.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2—3, 6, 9, 13—14, 16—19, 21, 23—24, 26—27, 29—31, 33—34, 38—44, 46, 49 см. REFERENCES)

1. Титов В.Н. *Клиническая биохимия. Курс лекций*. М.: ИНФРА-М; 2017.
4. Мазунии И.О., Володько Н.В. Митохондрии: жизнь в клетке и ее последствия. *Природа*. 2010; (10): 3—16.
5. Аладинский В.А., Никифоров Н.Г., Темченко А.В., Котьяшова С.Ю., Горлова О.Ю., Азарова И.Н. и др. Молекулярно-клеточные изменения при атеросклерозе. *Клиническая медицина*. 2015; 93(6): 14—8.
7. Титов В.Н., Пархимович Р.М. Филогенетическая теория общей патологии. Становление функции митохондрий при симбиозе бактериальных клеток и архей. Несостоятельность цикла Рендла, регуляция инсулином метаболизма жирных кислот и глюкозы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(7): 388—96.
8. Титов В.Н. *Метаболический синдром — переедание физиологичной пищи. Висцеральные жировые клетки, неэтерифицированные и свободные жирные кислоты*. М.: ИНФРА-М; 2017.
10. Дмитриев Л.Ф. С3-альдегиды и нарушение клеточного метаболизма: возможные способы нормализации углеводного обмена. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(2): 13—8.
11. Митянина В.А., Купцов В.Н., Савельев С.В., Швец В.И., Селищева А.А. Липидный состав эритроцитов детей на разных стадиях заболевания диабетом 1-го типа. *Биомедицинская химия*. 2012; 58(1): 95—103.
12. Акмурзина В.А., Петрайкина Е.Е., Савельев С.В., Селищева А.А. Профиль неэтерифицированных жирных кислот плазмы детей с разными сроками сахарного диабета I типа. *Биомедицинская химия*. 2016; 62(2): 206—11.
15. Титов В.Н. Биологическая функция трофологии (питания) и патогенез метаболического синдрома — физиологичного переедания. Филогенетическая теория общей патологии, лептин и адипонектин. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; (2): 68—79.
20. Зуева И.Б., Улитина А.С., Гораб Д.Н., Москаленко М.В., Дубина М.В. Полиморфизм гена apoE у пациентов с метаболическим синдромом и когнитивными расстройствами. *Артериальная гипертензия*. 2012; 18(5): 421—8.
22. Титов В.Н. Жирные кислоты, триглицериды, хиломикроны, эндоплазматическая сеть, паракринно регулируемые сообщества клеток и становление в филогенезе системы лимфотока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(6): 324—34.
25. Лизенко М.В., Ререград Т.И., Бахирев А.М., Лизенко Е.И. Сравнительно-биохимический анализ липидов липопротеинов сы-

- воротки крови человека и некоторых видов животных. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2008; 44(5): 492—501.
28. Титов В.Н., Амелюшкина В.А., Рожкова Т.А. Конформация apoB-100 в филогенетически и функционально разных липопротеиновых низкой и очень низкой плотности. Алгоритм формирования фенотипов гиперлипидемии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59(1): 27—36.
32. Титов В.Н. Физико-химические, биохимические, функциональные различия пальмитиновой и олеиновой жирных кислот. Патогенез атеросклероза, биологические основы профилактики и инсулин. *Кардиологический вестник*. 2015; 10(1): 68—76.
35. Лисицын Д.М., Разумовский С.Д., Тищенко М.А., Титов В.Н. Кинетические параметры окисления озоном индивидуальных жирных кислот. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2004; 138(11): 517—9.
36. Котельников С.Н. Основные механизмы взаимодействия озона с живыми системами и особенности проблемы приземного озона для России. В кн.: *Труды института общей физики имени А.М. Прохорова*. М.: Наука; 2013; 71: 10—38.
37. Титов В.Н., Якименко А.В., Котловский М.Ю., Ариповский А.В., Смирнов Г.П., Малышев П.П. Позиционные изомеры пальмитиновых и олеиновых триглицеридов, липолиз, конформация apoB-100, формирования apoE/B-100 лиганда и поглощения инсулинзависимыми клетками липопротеинов очень низкой плотности при действии статинов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(11): 736—43.
45. Титов В.Н. Резистентность к инсулину — различие регуляции метаболизма в филогенетически ранних висцеральных жировых клетках сальника и поздних инсулинзависимых подкожных адипоцитах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(9): 554.
47. Титов В.Н., Эммануэль В.Л. Патогенез атеросклероза активирован, когда филогенетически травоядные животные начинают в избытке поедать мясную (плотоядную) пищу. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(9): 553.
48. Титов В.Н., Ощепкова Е.В., Дмитриев В.А., Гущина О.В., Ширяева Ю.К., Яшин А.Я. Гиперурикемия — показатель нарушения биологических функций эндозологии и адаптации, биологических реакций экскреции, воспаления и артериального давления. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; (4): 3—14.
-
- ## REFERENCES
1. Titov V.N. *Clinical Biochemistry. Lecture course*. [Клиническая биохимия. Курс лекций]. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
2. Delou J.M., Biasoli D., Borges H.L. The Complex link between apoptosis and autophagy: a promising new role for RB. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2016; 88(4): 2257—75.
3. Zaragoza C., Gomez-Guerrero C., Martin-Ventura J.L., Blanco-Colio L., Lavín B., Mallavia B. et al. Animal models of cardiovascular diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 497841.
4. Mazunin I.O., Volod'ko N.V. Mitochondria: life in a cell and its consequences. *Priroda*. 2010; (10): 3—16. (in Russian)
5. Aladinskiy V.A., Nikiforov N.G., Temchenko A.V., Kotyashova S.Yu., Gorlova O.Yu., Azarova I.N. et al. Molecular and cellular changes in atherosclerosis. *Klinicheskaya meditsina*. 2015; 93(6): 14—8. (in Russian)
6. Serra D., Mera P., Malandrino M.L., Mir J.F., Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. *Antioxid. Redox. Signal.* 2013; 19(3): 269—84.
7. Titov V.N., Parkhimovich R.M. Phylogenetic theory of general pathology. Formation of mitochondrial function in symbiosis bacterial cells and archaea. Insolvency Randle cycle, regulation of insulin fatty acid and glucose metabolism. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(7): 388—96. (in Russian)
8. Titov V.N. *Metabolic Syndrome — Overeating Physiological Food. Visceral Fat Cells, and Non-Esterified Free Fatty Acids [Metabolicheskiy sindrom — pereedanie fiziologichnoy pishchi. Vistseral'nye zhirovye kletki, neeterifitsirovannye i svobodnye zhirnye kisloty]*. Moscow: INFRA-M; 2017. (in Russian)
9. Gano L.B., Patel M., Rho J.M. Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases. *J. Lipid. Res.* 2014; 55(11): 2211—28.
10. Dmitriev L.F. C3 aldehydes and violation of cellular metabolism: the possible ways of normalization of carbohydrate metabolism. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(2): 13—8. (in Russian)
11. Mityanina V.A., Kuptsov V.N., Savel'ev S.V., Shvets V.I., Selishcheva A.A. The lipid composition of red blood cells of children at different stages of the disease of type 1 diabetes. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2012; 58(1): 95—103. (in Russian)
12. Akmurzina V.A., Petryaykina E.E., Savel'ev S.V., Selishcheva A.A. Profile of plasma non-esterified fatty acids, children with different terms of type 1 diabetes. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2016; 62(2): 206—11. (in Russian)
13. Oda M.N. Lipid-free apoA-I structure - Origins of model diversity. *Biochim. Biophys. Acta*. 2017; 1862(2): 221—33.
14. Annema W., von Eckardstein A. High-density lipoproteins. Multifunctional but vulnerable protections from atherosclerosis. *Circ. J.* 2013; 77(10): 2432—48.
15. Titov V.N. The biological function of trophic ecology (food) and the pathogenesis of the metabolic syndrome — the physiological overeating. *Phylogenetic Theory of General Pathology, leptin and adiponectin. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; (2): 68—79. (in Russian)
16. Ivanova E.A., Orekhov A.N. The role of Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(2). pii: E193.
17. Vazquez-Jimenez J., Chavez-Reyes J., Romero-Garcia T., Zarain-Herzberg A., Valdes-Flores J., Galindo-Rosales J.M. Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression. *Cell. Signal.* 2016; 28(1): 53—9.
18. Suzuki T., Brown J.J., Swift L.L. Identification of a novel transcript and regulatory mechanism for microsomal triglyceride transfer protein. *PLoS One*. 2016; 11(1): e0147252.
19. Aspelund A., Robciuc M.R., Karaman S., Makinen T., Alitalo K. Lymphatic system in cardiovascular medicine. *Circ. Res.* 2016; 118(3): 515—30.
20. Zueva I.B., Ulitina A.S., Gorab D.N., Moskalenko M.V., Dubina M.V. ApoE gene polymorphism in patients with metabolic syndrome and cognitive disorders. *Arterial'naya gipertenziya*. 2012; 18(5): 421—8. (in Russian)
21. Phillips M.C. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. *IUBMB Life*. 2014; 66(9): 616—23.
22. Titov V.N. Fatty acids, triglycerides, chylomicrons, endoplasmic reticulum, cell paracrine regulated community and formation in phylogeny lymph system. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(6): 324—34. (in Russian)
23. Xenoulis P.G., Cammarata P.J., Walzem R.L., Macfarlane R.D., Suchodolski J.S., Steiner J.M. Novel lipoprotein density profiling in healthy dogs of various breeds, healthy Miniature Schnauzers, and Miniature Schnauzers with hyperlipidemia. *BMC Vet. Res.* 2013; 9: 47—56.
24. Emken E. Human studies using isotope labeled fatty acids: answered and unanswered questions. *J. Oleo. Sci.* 2013; 62(5): 245—55.
25. Lizenko M.V., Reherand T.I., Bakhirev A.M., Lizenko E.I. Comparative lipoprotein lipid biochemical analysis of human serum and several animal species. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimi i fiziologii*. 2008; 44(5): 492—501. (in Russian)
26. Pillon N.J., Azizi P.M., Li Y.E., Liu J., Wang C., Chan K.L. et al. Palmitate-induced inflammatory pathways in human adipose microvascular endothelial cells promote monocyte adhesion and impair insulin transcytosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2015; 309(1): E35—44.
27. Knowles C.J., Cebova M., Pinz I.M. Palmitate diet-induced loss of cardiac caveolin-3: a novel mechanism for lipid-induced contractile dysfunction. *PLoS One*. 2013; 8(4): e61369.
28. Titov V.N., Amelyushkina V.A., Rozhkova T.A. Conformation of apoB-100 in phylogenetically and functionally different lipoproteins of low and very low density. The algorithm of formation of phenotypes hyperlipoproteinemia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59(1): 27—36. (in Russian)
29. Suto A., Yamasaki M., Takasaki Y., Fujita Y., Abe R., Shimizu H. et al. LC-MS/MS analysis of canine lipoproteins fractionated using the ultracentrifugation-precipitation method. *J. Vet. Med. Sci.* 2013; 75(11): 1471—7.
30. Nguyen-Lefebvre A.T., Horuzko A. Kupffer cell metabolism and function. *J. Enzymol. Metab.* 2015; 1(1). pii: 101.
31. Bharadwaj K.G., Hiyama Y., Hu Y., Huggins L.A., Ramakrishnan R., Abumrad N.A. et al. Chylomicron- and VLDL-derived lipids enter the heart through different pathways: in vivo evidence for receptor- and non-receptor-mediated fatty acid uptake. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(49): 37976—86.
32. Titov V.N. The physico-chemical, biochemical and functional differences palmitic and oleic fatty acids. The pathogenesis of atherosclerosis, the biological basis of prevention and insulin. *Kardiologicheskij vestnik*. 2015; 10(1): 68—76. (in Russian)
33. Dobrzyn A., Dobrzyn P. Stearoyl-CoA desaturase — a new player in skeletal muscle metabolism regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 57 Suppl 10: 31—42.
34. Wang Y., Botolin D., Xu J., Christian B., Mitchell E., Jayaprakasam B. et al. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J. Lipid. Res.* 2006; 47(9): 2028—41.
35. Lisitsyn D.M., Razumovskiy S.D., Tishenin M.A., Titov V.N. Kinetic parameters of individual ozone oxidation of fatty acids. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2004; 138(11): 517—9. (in Russian)
36. Kotel'nikov S.N. Basic mechanisms of ozone interaction with living systems, and especially the problem of ground-level ozone for Russia. In: *Proceedings of the Institute of General Physics Named after A.M. Prokhorov [Trudy instituta obshchey fiziki imeni A.M. Prokhorova]*. Moscow: Nauka; 2013; 71: 10—38. (in Russian)
37. Titov V.N., Yakimenko A.V., Kotlovskiy M.Yu., Aripovskiy A.V., Smirnov G.P., Malyshev P.P. Positional isomers palmitic and oleic

- triglyceride lipolysis conformation of apoB-100, forming apoE/ligand-100 cells and insulin-dependent uptake of very low density lipoproteins in the action of statins. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(11): 736—43. (in Russian)
38. Kuroda I., Nagai T., Mizobe H., Yoshimura N., Gotoh N., Wada S. HPLC separation of triacylglycerol positional isomers on a polymeric ODS column. *Anal. Sci.* 2008; 24(7): 865—9.
39. Herrera L.C., Potvin M.A., Melanson J.E. Quantitative analysis of positional isomers of triacylglycerols via electrospray ionization tandem mass spectrometry of sodiated adducts. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 2010; 24(18): 2745—52.
40. Brereton M.F., Rohm M., Shimomura K., Holland C., Tornovsky-Babeay S., Dadon D. Hyperglycaemia induces metabolic dysfunction and glycogen accumulation in pancreatic β -cells. *Nat. Commun.* 2016; 7: 13496.
41. Shi W., Hu S., Wang W., Zhou X., Qiu W. Skeletal muscle-specific CPT1 deficiency elevates lipotoxic intermediates but preserves insulin sensitivity. *J. Diabet. Res.* 2013; 2013: 163062.
42. Gao D., Nong S., Huang X., Lu Y., Zhao H., Lin Y. et al. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(39): 29965—73.
43. Wiley A.S. Cow milk consumption, insulin-like growth factor-I, and human biology: a life history approach. *Am. J. Hum. Biol.* 2012; 24(2): 130—8.
44. Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1841(7): 919—33.
45. Titov V.N. Insulin resistance — a difference in the regulation of metabolism phylogenetically earlier visceral fat cells omentum and subcutaneous adipocytes insulin-dependent later. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(9): 554. (in Russian)
46. Ipsen D.H., Tveden-Nyborg P., Rolin B., Rakipovski G., Beck M., Mortensen L.W. et al. High-fat but not sucrose intake is essential for induction of dyslipidemia and non-alcoholic steatohepatitis in guinea pigs. *Nutr. Metab. (Lond)*. 2016; 13: 51—61.
47. Titov V.N., Emmanuel V.L. The pathogenesis of atherosclerosis is activated when phylogenetically herbivores start to eat meat in excess (carnivorous) food. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(9): 553. (in Russian)
48. Titov V.N., Oshchepkova E.V., Dmitriev V.A., Gushchina O.V., Shiryayeva Yu.K., Yashin A.Ya. Hyperuricemia — an indicator of impaired biological functions endoecology and adaptation of biological reactions excretion, blood pressure and inflammation. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; (4): 3—14. (in Russian)
49. Wu I.H., Wu J.S., Sun Z.J., Lu F.H., Chang C.S., Chang C.J. et al. Higher serum uric acid level increases risk of prehypertension in subjects with normal glucose tolerance, but not pre-diabetes and diabetes. *J. Hum. Hypertens.* 2016; 30(8): 479—82.

Поступила 15.10.16
Принята к печати 29.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.36-002.2-06:616-002.5

Арямкина О.Л., Савоненкова Л.Н., Рузов В.И., Мидленко В.И., Гноевых В.В., Разин В.А., Гимаев Р.Х.

ХРОНИЧЕСКИЙ ГЕПАТИТ ПРИ ЛЁГОЧНОМ, ВНЕЛЁГОЧНОМ И АБДОМИНАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЁЗЕ

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», 432017, Ульяновск, Россия

Полиморбидность — актуальная проблема клинической медицины. Хронический гепатит и туберкулёз относятся к распространённым социально значимым заболеваниям, в то время как их взаимоотношения не изучены. Цель работы — изучение частоты встречаемости, структуры и клиники хронического гепатита, протекающего в коморбидности с туберкулёзом различных локализаций. Методом сплошной выборки проведено когортное рандомизированное одномоментное исследование по изучению частоты, структуры, клиники хронического гепатита у 1189 больных туберкулёзом, в том числе лёгочных (n = 1125), внелёгочных (n = 24), абдоминальных (n = 40) локализаций. Хронический гепатит диагностирован в 43% случаев и в половине из них — на стадии обострения (53,2%), когда он представлен вирусным (59,6), преимущественно гепатитом С, алкогольным (25,7), неалкогольным (9,8) и лекарственным (4,9%) стеатогепатитом. Хронический гепатит сопутствует лёгочному туберкулёзу в 3,4—1,7 раза чаще, чем внелёгочному и абдоминальному. Хронический гепатит характеризуют минимальная и умеренная активность воспаления. Хроническому гепатиту при абдоминальном туберкулёзе присущи более выраженные изменения всех лабораторных синдромов гепатита. Лекарственный гепатит встретился только при туберкулёзе легких.

Хронический гепатит С и В, протекающий коморбидно, характеризуется малосимптомностью, цитолизом с 2,3—2,8 нормами АЛТ, АСТ, минимальной паренхиматозной желтухой и холестазом с активностью ГГТП 2,86 норм, мезенхимальным воспалением в 3,1—3,4 раза чаще при его коморбидности с внелёгочным и абдоминальным туберкулёзом. Для алкогольного стеатогепатита характерны высокий цитолиз, преобладание активности АСТ над АЛТ, более яркие паренхиматозная желтуха и холестаза. Неалкогольному стеатогепатиту свойственны полиморбидность ещё и с ожирением, сахарным диабетом 2-го типа, кардиоваскулярной патологией, стеатозом печени, самые низкие параметры маркеров цитолиза, мезенхимального воспаления, желтухи, холестаза и нормальные значения маркеров печёчно-клеточной недостаточности. Лекарственный гепатит характеризуется нарастанием слабости, тошнотой, рвотой, развитием желтухи, кожного зуда, гепатомегалии, цитолиза, холестаза, гипербилирубинемии на фоне специфической полихимиотерапии.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит; стеатогепатит; туберкулёз; особенности клиники.

Для цитирования: Арямкина О.Л., Савоненкова Л.Н., Рузов В.И., Мидленко В.И., Гноевых В.В., Разин В.А., Гимаев Р.Х. Хронический гепатит при лёгочном, внелёгочном и абдоминальном туберкулёзе. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(8): 462-467. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-462-467>

Aryamkina O.L., Savonenkova L.N., Ruzov V.I., Midlenko V.I., Gnoevykh V.V., Razin V.A., Gamaev R.Kh.

THE CHRONIC HEPATITIS UNDER PULMONARY, EXTRA-PULMONARY AND ABDOMINAL TUBERCULOSIS

The Ulyanovskii state university, 432017 Ulyanovsk, Russia

Для корреспонденции: Арямкина Ольга Леонидовна, д-р мед. наук, проф.; e-mail: AOL56@yandex.ru

The poly-morbidity is an actual problem of clinical medicine. The chronic hepatitis and tuberculosis are among widespread socially significant diseases while their relationship needs further investigation. The purpose of study is to analyze rate of occurrence, structure and clinic a chronic hepatitis taking course in comorbidity with tuberculosis of various localizations. The technique of continuous sampling was applied to carry out cohort randomized single-staged study analyzing rate structure and clinic of chronic hepatitis in 1189 patients with tuberculosis including pulmonary (n=1125), extra-pulmonary (n=24), abdominal (n=40) localizations. The chronic hepatitis is established in 45% of all cases and in half of cases out of them at the stage of exacerbation (53.2%) when the disease is presented by viral (59.6%) predominantly hepatitis C, alcoholic (25.7%), non-alcoholic (9.8%) and medicinal (4.9%) steatohepatitis. The chronic hepatitis associates with pulmonary tuberculosis 3.4-1.7 times more often than with extra-pulmonary and abdominal tuberculosis. The chronic hepatitis is characterized by minimal and moderate activity of inflammation. The chronic hepatitis in case of abdominal tuberculosis manifests more expressed alterations of all laboratory syndromes of hepatitis. The medicinal hepatitis was established only in case of pulmonary tuberculosis. The chronic hepatitis C and B progresses in a comorbide way, is characterized by little symptoms, cytolysis with 2.3-2.8 standards of ALT, AST, minimal parenchymatous jaundice and cholestasis with activity of GGTP 2.86 of standards, mesenchymal inflammation in 3.1-3.4 times more often in case of its comorbidity with extra-pulmonary and abdominal tuberculosis. The alcoholic steatohepatitis is characterized by higher cytolysis, predominance of activity of AST over ALT, more expressed parenchymatous jaundice and cholestasis. The non-alcoholic steatohepatitis is characterized by poly-morbidity with diabetes mellitus type II also, cardiovascular pathology, steatosis of liver, the lowest parameters of markers of cytolysis, mesenchymal inflammation, jaundice, cholestasis and normal values of markers of hepatic cellular inadequacy. The medicinal hepatitis is characterized by increasing of asthenia, nausea, development of jaundice, skin itching, hepatomegaly, cytolysis, cholestasis, hyper-bilirubinemia against the background of specific poly-chemotherapy.

Key words: *chronic viral hepatitis; steatohepatitis; tuberculosis; clinical features*

For citation: *Aryamkina O.L., Savonenkova L.N., Ruzov V.I., Midlenko V.I., Gnoevy'kh V.V., Razin V.A., Gamaev R.Kh. The chronic hepatitis under pulmonary, extra-pulmonary and abdominal tuberculosis. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (8): 462-467. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-462-467>*

For correspondence: *Aryamkina O.L., doctor of medical sciences, professor. e-mail: AOL56@yandex.ru*

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 11.04.2017
Accepted 15.04.2017

Полиморбидность в клинике внутренних болезней — актуальная проблема клинической медицины [1—6]. У большинства больных встречаются два и более заболевания одновременно, нередко в комбинациях, что определено объективными факторами — изменением условий жизни современного человека, воздействием на организм неблагоприятных факторов внешней среды, особенностями современного питания, аллергизацией — вызывающими изменение течения и симптоматики многих заболеваний [7—9]. Оценка полиморбидности продиктована необходимостью дифференцированного подхода в мониторинге и лечении больных, что определяет необходимость изучения аспектов этиологии и патогенеза полиморбидной патологии [10—14].

Хронический гепатит — распространенное заболевание, представленное на всех стадиях его течения, преимущественно вирусным (HCV, HBV) гепатитом и стеатогепатитом. Стеатогепатит чаще всего формируется под воздействием токсических доз алкоголя, развивается в рамках метаболического синдрома, токсических и лекарственных поражений печени, протекает как заболевание, осложняющее течение болезней других органов и систем [15—20]; <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.25762/full>. Вместе с тем на рубеже XX—XXI веков всё чаще диагностируют абдоминальный туберкулёз, при котором в специфический процесс вовлекается печень [21—23]. Таким образом, хронический гепатит и туберкулёз — распространенные заболевания в мире, которые отнесены к социально-значимой патологии современной России. В этой связи изучение клинических проявлений хронического гепатита, протекающего на фоне туберкулёза, весьма актуально, что определило необходимость проведения настоящего исследования.

Цель настоящей работы — изучение частоты встречаемости, структуры и клиники хронического гепатита, протекающего в коморбидности с туберкулёзом различных локализаций.

Задачи: 1) изучение частоты встречаемости хронического гепатита при туберкулёзе легочных, внелегочных и абдоминальных локализаций; 2) анализ структуры хронического

гепатита, протекающего в коморбидности с легочным, внелегочным и абдоминальным туберкулёзом; 3) оценка клинической картины хронического гепатита при лёгочном, внелегочном и абдоминальном туберкулёзе с учетом его этиологии.

Материал и методы. Когортное, рандомизированное, одномоментное исследование, проведено методом сплошной выборки. Частота, структура и клиническая картина хронического гепатита изучена у 1189 больных туберкулёзом, прореченных в ОПТД за 3 года, в том числе: туберкулёзом органов дыхания ($n = 1125$); внелегочным туберкулёзом ($n = 24$); абдоминальным туберкулёзом ($n = 40$). Правила включения: все случаи хронического гепатита, установленного по клиническим, биохимическим, иммунологическим маркерам (HBsAg, HCVAb); правила исключения — случаи HBV- и HCV-инфицирования без клинико-лабораторных признаков гепатита, острого гепатита и туберкулёзного гепатита.

Клинические диагнозы «хронический гепатит» и «туберкулёз» устанавливали по общепринятым стандартам диагностики с использованием комплекса клинических, лабораторных, микробиологических, инструментальных и морфологических методов исследования.

Всем пациентам определяли маркеры HBV- и HCV-инфекции — HBsAg, HCVAb, реже — спектр маркеров гепатита В методом иммуноферментного анализа на мультипланшетном фотометре Multiskan EX (Финляндия) с диагностическими тест-системами НИИ вакцин и сывороток (Москва, Нижний Новгород). Исследования биохимических параметров проведены на аппарате Hitashi 911 (1993 г., Япония, реактивы фирмы Roche). Инструментальные методы включали проведение рентгенологических, эндоскопических, ультрасонографических методов исследования. По показаниям проводились компьютерная томография, магнитно-резонансная томография. В случаях летальных исходов оценивали морфологические субстраты органов. Гистологические препараты готовили по стандартным методикам с оценкой под микроскопами фирмы «Биолам» (Санкт-Петербург) и выполнялись в патологоанатомических отделениях — УОКБ, ЦКБ Ульяновска.

Абдоминальный туберкулёз верифицирован по морфоло-

гическим параметрам в 37 (92,5%) случаях при заборе биопсийного материала во время эндоскопии — у 3 человек, экстренной лапаротомии — у 16, лапароскопии — у 9, постмортально — у 9 человек. У 3 пациентов диагноз был поставлен по клиническим данным с положительной динамикой на химиотерапию.

У больных хроническим гепатитом, коморбидным с туберкулёзом лёгких в половине случаев — 580 из 1125 (51,6%) диагностировали инфильтративную, в трети — 370 (32,9%) — фиброзно-кавернозную, реже — в 147 (12,9%) — очаговую, ещё реже — 28 (2,4%) другие формы (плеврит, туберкулёму, первичный комплекс). Деструкцию лёгочной ткани выявляли в 726 (64,5%) случаях, бактериовыделение — в 690 (61,3%) наблюдениях.

У пациентов с хроническим гепатитом, коморбидным с внелёгочным туберкулёзом, в 12 из 24 случаев диагностировали нефротуберкулёз, в 9 случаях — туберкулёз оболочек мозга, в 6 случаях — туберкулёз костей и суставов, а в 3 — гениталий, в 3 — гортани. При этом в каждом третьем случае ($n = 9$, 37,5%) имело место одновременное специфическое поражение мочевыделительной, костно-суставной и нервной систем.

У больных с хроническим гепатитом, коморбидным с абдоминальным туберкулёзом, в 11 из 40 наблюдений имело место специфическое поражение кишечника, в 9 — брюшины, в 3 — внутрибрюшных лимфатических узлов, а у каждого второго пациента ($n = 17$) диагностировано одновременное вовлечение в туберкулёзный процесс брюшины, кишечника и внутрибрюшных лимфоузлов. У 36 (90%) человек абдоминальный туберкулёз протекал в рамках генерализованного специфического процесса с поражением лёгких ($n = 28$), периферических лимфоузлов, гениталий, гортани ($n = 8$).

Анализ полученных данных выполнялся на IBM-совместимых компьютерах с использованием статистических программных пакетов Statistica 10.0 for Windows, SPSS 13.0 for Windows. Применяли параметрические и непараметрические методы статистической обработки.

Результаты и обсуждение. За трехлетний период в ОПТД получили лечение 2643 больных, в том числе: 2334 (88,4%) с лёгочной, 169 (6,4%) с внелёгочной и 140 (5,2%) с абдоминальной локализацией процесса, что находится в соответствии с клинической структурой туберкулёза в целом по стране и в регионе.

Клинико-лабораторные признаки гепатита выявлены в 45% случаев — среди 1189 из 2643 госпитальных больных туберкулёзом, в том числе: среди лёгочных — 1125 (48,2%), внелёгочных — 24 (14,2%) и абдоминальных — 40 (28,6%) локализаций. Таким образом, хронический гепатит сопутствует лёгочному туберкулёзу в 3,4 раза чаще, чем внелёгочному ($\chi^2 = 34,2$, $p = 0$) и в 1,7 раза чаще, чем абдоминальному ($\chi^2 = 8,34$, $p = 0,004$). В 19 из 1189 случаях (1,6%) хронический гепатит диагностирован на стадии цирроза.

Возраст больных хроническим гепатитом, протекающим в коморбидности с туберкулёзом, составил $40,7 \pm 0,81$ (95% ДИ 39,1—42,3) лет, соотношение мужчин и женщин — 4,5:1. Наиболее молодой возраст был у пациентов с хроническим гепатитом, коморбидным с абдоминальным туберкулёзом — $38,3 \pm 1,31$ (95% ДИ 35,7—40,9) года ($p = 0,01$). Преобладание количества мужчин над числом женщин в этой группе было наименьшим — 2,2:1 ($p = 0,03$).

Лабораторные признаки хронического гепатита выявлены у пациентов всех 3 групп. Маркеры цитолиза выявлялись в 55—70%, мезенхимального воспаления в 60—80%, печеночно-клеточной недостаточности — в 40—55%, холестаза — 25—52% наблюдений. Значительно реже определялась гипербилирубинемия — лишь в 12—25% случаев (рис. 1).

Таким образом, хронический гепатит у больных туберкулёзом в 632 (53,2%) из 1189 случаев был в стадии обострения, в том числе в коморбидности с туберкулёзом лёгких, внелёгочных и абдоминальных локализаций в 52,7% ($n = 593$), в 70,8%

($n = 17$) и в 55% ($n = 22$) случаев соответственно без статистически значимых различий в 3 группах ($\chi^2 = 2 \cdot 2$, $p > 0,05$).

Частота встречаемости гепатологических синдромов у больных туберкулёзом лёгочных и внелёгочных локализаций идентична. Однако при хроническом гепатите, сопутствующем абдоминальному туберкулёзу, признаки мезенхимального воспаления ($p < 0,05$), холестаза ($p < 0,001$) и желтухи ($p < 0,05$) регистрируются в 1,4 и в 2,1 раза чаще.

Активность АЛТ и АСТ превышала нормальное значение ферментов в 1,3—2,5 раза во всех группах больных с наибольшими значениями при хроническом гепатите у больных с внелёгочным $90,6 \pm 10,6$ U/l (95% ДИ 68,2—113) и абдоминальным $84,6 \pm 5,43$ U/l (95% ДИ 73,2—96,1) туберкулёзом.

Повышение тимоловой пробы от 1,2 до 2—2,5 норм регистрируется в каждом втором случае хронического гепатита, сочетанного с туберкулёзом, в том числе 49—50,8—47,5% случаев при лёгочных, внелёгочных и абдоминальных локализациях ($p > 0,05$). Наибольших значений повышение тимоловой пробы имеет место при хроническом гепатите, коморбидном с абдоминальным — $7,87 \pm 0,29$ ед. (95% ДИ 7,27—8,47) и внелёгочным — $7,08 \pm 0,56$ ед. (95% ДИ 5,51—8,64) туберкулёзом, что значительно выше, чем при хроническом гепатите, протекающем на фоне туберкулёза лёгких ($p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$).

По параметрам цитолиза и мезенхимального воспаления определили лабораторную активность хронического гепатита, которая соответствовала преимущественно минимальной, реже умеренной степени.

Понижение альбуминов встречается в 37,9% при хроническом гепатите, протекающем в коморбидности с туберкулёзом, чаще всего при хроническом гепатите у больных абдоминальным (45%, $p = 0$) и внелёгочным (37,5%, $p = 0,01$) туберкулёзом. Хотя самый низкий показатель альбуминов в сыворотке крови составил $30 \pm 2,54$ г/л (95% ДИ 22,9—37,1) при хроническом гепатите у больных туберкулёзом лёгких, гипоальбуминемия встречается в 3,4 и в 1,5 раза чаще при хроническом гепатите на фоне абдоминального туберкулёза, чем при хроническом гепатите на фоне туберкулёза лёгочных и внелёгочных локализаций. Протромбин крови понижался до 62—73% при хроническом гепатите, протекающем в коморбидности с туберкулёзом различных локализаций, чаще у больных хроническим гепатитом, коморбидным с абдоминальным (55%, $p = 0$) и внелёгочным (37,5%, $p = 0,018$) туберкулёзом. Столь низкие параметры печеночно-клеточной недостаточности могут быть объяснимы не только признаками гепатита, но и выраженностью специфического инфекционного процесса, на фоне которого он протекает.

Гипербилирубинемия встречается с одинаковой частотой при хроническом гепатите коморбидного варианта течения

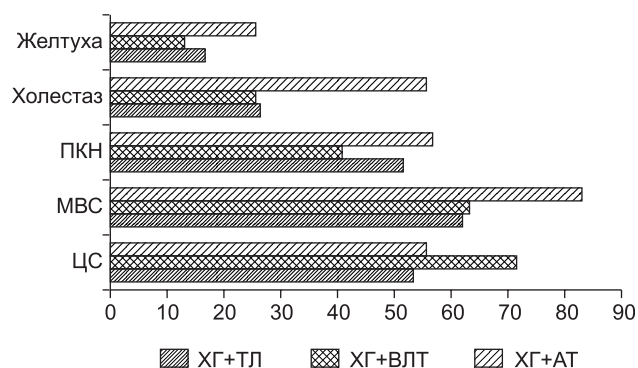


Рис. 1. Частота лабораторных синдромов хронического гепатита при его коморбидности с туберкулёзом лёгочных, внелёгочных и абдоминальных локализаций (в %).

— от 12,5 до 25% случаев в 3 группах больных ($p > 0,05$). Значения гипербилирубинемии достигают 1,2—2,2 норм соответственно при хроническом гепатите, протекающем в коморбидности с лёгочным и внелёгочным туберкулёзом. Однако максимальных цифр повышение билирубина — до 3,5 норм — достигает при хроническом гепатите, коморбидным с абдоминальным туберкулёзом. У больных хроническим гепатитом, протекающим на фоне абдоминального туберкулёза, диагностируется паренхиматозная желтуха с соотношением фракций билирубина 1:1, а на фоне туберкулёза лёгких преобладает непрямая гипербилирубинемия, что может свидетельствовать как о туберкулёзной интоксикации, так и побочном действии противотуберкулёзной полихимиотерапии.

Лабораторные маркеры холестаза — повышение активности ГГТП и ЩФ чаще всего регистрируются при хроническом гепатите, протекающем в коморбидности с абдоминальным туберкулёзом, где они повышались в 2/3 и более случаев. Активность ГГТП повышается вдвое чаще при хроническом гепатите, коморбидном с абдоминальным туберкулёзом по сравнению с хроническим гепатитом, коморбидном с туберкулёзом лёгочных ($p = 0,014$) и внелёгочных ($p = 0,0338$) локализаций. Показатель повышается до 1,5—2,5 норм при хроническом гепатите, сочетающемся с туберкулёзом с наибольшим значением при хроническом гепатите, коморбидном с абдоминальным туберкулёзом, достигнув значения $105,3 \pm 18,4$ U/l (95% ДИ 57,9—152,7).

Активность ЩФ повышается до 1,2—1,6 норм у каждого третьего (31,6%) больного хроническим гепатитом, протекающим на фоне туберкулёза, особенно абдоминального ($p = 0$). Среди 3 групп больных хроническим гепатитом, протекающим в коморбидности с туберкулёзом, активность ЩФ достигла значений $142 \pm 6,92$ U/l (95% ДИ 61,2—122,8) — $158,9 \pm 4,90$ U/l (95% ДИ 70,5—147,3).

При изучении генеза хронического гепатита у 1189 больных туберкулёзом установили, что преобладает вирусная HCV- и HBV-этиология, встретившаяся в 2/3 случаев ($n = 709$, 59,6%) (рис. 2).

Выявлено преобладание хронической HCV-инфекции ($n = 1093$; 91,9%) над хронической моно- и микстинфекцией HBV ($n = 96$; 8,1%). Вирусный гепатит С и В встречается в 59,5% (670 из 1125) в структуре хронического гепатита, коморбидного с туберкулёзом органов дыхания, т. е. одинаково часто в сравнении с внелёгочным — 70,8% или 17 из 24 ($p > 0,05$) и 55% или 22 из 40 случаев — абдоминальным туберкулёзом ($p > 0,05$) (см. рис. 2, таблицу).

У 480 из 1189 (40,4%) больных хроническим гепатитом, коморбидным с туберкулёзом, был диагностирован стеатогепатит — алкогольный ($n = 306$; 25,7%), неалкогольный ($n = 116$; 9,8%) и лекарственный ($n = 58$; 4,9%) (см. рис. 2). Алкогольный стеатогепатит составил 25,8% ($n = 290$) в структуре хронического гепатита, коморбидного с лёгочным, 12,5 ($n = 3$) — с внелёгочным и 32,5% ($n = 13$) — с абдоминальным туберкулёзом ($p > 0,05$) (см. таблицу).

Поскольку у 306 пациентов указанной группы имелись указания на злоупотребление алкоголем в течение $11,4 \pm 0,71$ (95% ДИ 7,34—13,9) лет и заключение нарколога об алкоголизме, у них был диагностирован алкогольный стеатогепатит. Частота алкогольного стеатогепатита в структуре хронического гепатита, протекающего на фоне туберкулёза, составила 25,7%. Алкогольный стеатогепатит составил 25,8% ($n = 290$) в структуре хронического гепатита, коморбидного с лёгочным, 12,5 ($n = 3$) — с внелёгочным и 32,5% ($n = 13$) — с абдоминальным туберкулёзом. Различия оказались статистически не значимыми ($p > 0,05$) (см. рис. 2, таблицу).

У 116 больных хроническим гепатитом, коморбидным с туберкулёзом, диагностирована неалкогольная жировая болезнь печени. Она встретилась с одинаковой частотой в структуре хронического гепатита, коморбидного с туберкулёзом органов дыхания, внелёгочном и абдоминальным ту-

беркулёзе — 12% ($n = 107$) — 16,7 ($n = 4$) — 12,5% ($n = 5$) соответственно (см. таблицу). Среди больных этой группы во всех случаях выявлены клинические проявления сахарного диабета и сердечно-сосудистой патологии. Им диагностирована неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), протекающая в рамках метаболического синдрома X. В структуре хронического гепатита, коморбидного с туберкулёзом, неалкогольный стеатогепатит, протекающий в рамках метаболического синдрома, имеет место в 9,8% случаев.

У 58 больных клинико-лабораторные признаки гепатита развились в ответ на противотуберкулёзную терапию при лёгочном туберкулёзе, преимущественно при его хроническом течении. Клинически лекарственный гепатит характеризовался тяжестью в правом подреберье, тошнотой, умеренной гепатомегалией, паренхиматозной желтухой, холестазом и мезенхимальным воспалением. Явления лекарственного гепатита подвергались регрессии после отмены и коррекции полихимиотерапии и назначения гепатопротекторов, преимущественно эссенциальных фосфолипидов. Частота лекарственного гепатита в структуре хронического гепатита у больных туберкулёзом составила 4,9% всей группы. Он наблюдался только у больных хроническим гепатитом, коморбидным с туберкулёзом лёгких (см. рис. 2, таблицу).

Анализ клинической картины хронического гепатита — вирусного и стеатогепатита, протекающего в коморбидности с туберкулёзом, показал, что больные отмечают слабость, которая может быть проявлением ещё и туберкулёзной интоксикации. Клинические параметры печёночно-клеточной недостаточности — такие как похудение, понижение аппетита при хроническом гепатите, у больных туберкулёзом оценить сложно в связи с проявлениями основной патологии, а кровоточивости и иных признаков геморрагического синдрома не выявлено ни в одном случае. Гепатомегалия определена в 49—50,8—55% случаев хронического гепатита у больных туберкулёзом лёгочных, внелёгочных и абдоминальных локализаций ($p > 0,05$).

По анамнезу установлено, что хронический гепатит С и/или В был продолжительностью от 1 до 14 лет — $8,5 \pm 0,15$ (95% ДИ 3,25—9,11) лет. Особенностью клинической картины хронического гепатита С и В, протекающего в коморбидности с туберкулёзом, является малосимптомность. Определялись незначительная гепатомегалия, субиктеричность видимых слизистых оболочек. Лабораторно при хроническом вирусном гепатите коморбидного с туберкулёзом течения определяются: цитолиз с повышением активности АЛТ и АСТ до 2,8—2,3 норм; истинная паренхиматозная желтуха с повышением билирубина до 1,43 норм и с соотношением его фракций 1:1; холестаза с повышением активности ГГТП и ЩФ до 2,86 и 1,45 норм, которые не зависели от локализации туберкулёзного процесса. А повышение уровня тимоловой пробы как маркера мезенхимально-воспалительного синдрома у больных хроническим вирусным гепатитом в 3,1—3,4 раза чаще встречается при внелёгочном и абдоминальном туберкулёзе ($p < 0,05$). Печёночно-клеточную недостаточность по её маркерам — гипоальбунемии и сни-

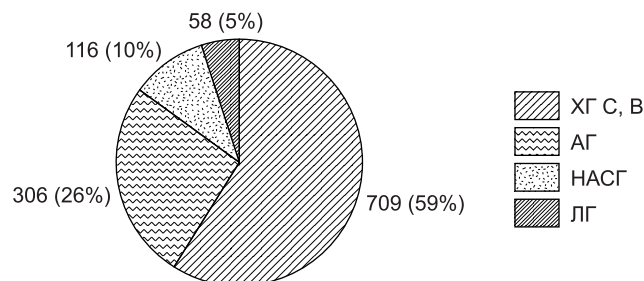


Рис. 2. Структура хронического гепатита, коморбидного с туберкулёзом.

Этиология хронического гепатита, коморбидного с туберкулёзом лёгочных, внелёгочных и абдоминальных локализаций, %

Этиология хронического гепатита	Коморбидный с туберкулёзом лёгких ($n = 1125$)	Коморбидный с внелёгочным туберкулёзом ($n = 24$)	Коморбидный с абдоминальным туберкулёзом ($n = 40$)
Вирусный гепатит HCV, HBV	59,6 ($n = 670$)	70,8 ($n = 17$)	55 ($n = 22$)
Алкогольный гепатит	25,8 ($n = 290$)	12,5 ($n = 3$)	32,5 ($n = 13$)
Неалкогольный стеатогепатит	12,0 ($n = 107$)	16,7 ($n = 4$)	12,5 ($n = 5$)
Лекарственный гепатит	5,2 ($n = 58$)	—	—

жению уровня протромбина при хроническом гепатите С и В, протекающем коморбидно с внелёгочным и абдоминальным туберкулёзом, выявляли в 2,4 и 2,5 раза чаще, чем при коморбидности с туберкулёзом лёгких ($p < 0,05$). Вероятно, данные маркеры свидетельствуют не только об обострении гепатита, но и косвенно подтверждают значение туберкулёзной интоксикации в развитии печёночно-клеточной недостаточности и мезенхимально-воспалительного синдрома у больных хроническим вирусным гепатитом при туберкулёзе.

Злоупотребление алкоголем в течение $11,4 \pm 0,71$ (95% ДИ 7,34—13,9) лет отмечали больные туберкулёзом, которые имели заключение нарколога, установившего диагноз «алкогольная болезнь». Наиболее часто больные хроническим алкогольным стеатогепатитом, протекающим в коморбидности с туберкулёзом, отмечали слабость, которая может быть проявлением ещё и специфической интоксикации. Клинические параметры печёночно-клеточной недостаточности — такие как похудание, понижение аппетита при хроническом гепатите у больных туберкулёзом, также сложно оценить в связи с проявлениями основной патологии, а кровоточивости и иных признаков геморрагического синдрома не выявлено ни в одном случае. Клинико-лабораторные особенности алкогольного стеатогепатита: нормальный индекс массы тела (93,8%) — $22,1 \pm 0,3$ (95% ДИ 21,5—22,7) $\text{кг}/\text{м}^2$, варьирующий от 18 до 25,7 $\text{кг}/\text{м}^2$ у большинства пациентов; высокий уровень активности АСТ в сравнении с АЛТ и более выраженная гипербилирубинемия. Для алкогольного стеатогепатита, протекающего в коморбидности с туберкулёзом, патогномичны истинная паренхиматозная желтуха с соотношением фракций билирубина 1:1 и наибольшая активность маркеров холестаза — ГГТП и ЩФ достигших $227,4 \pm 14,3$ U/l (95% ДИ 197,9—256,8) и $233,7 \pm 9,49$ U/l (95% ДИ 214,1—253,2) соответственно.

Неалкогольный стеатогепатит, протекающий в коморбидности с туберкулёзом, имел особенности. Он сочетался ещё с ожирением, сахарным диабетом и сердечно-сосудистой патологией. У больных данной группы определялись избыточный вес с ИМТ $33,9 \pm 0,3$ (95% ДИ 33,3—34,5) $\text{кг}/\text{м}^2$ по Кетле при абдоминальном типе ожирения, у трети (35 из 116 или 30,2%) — гиперхолестеринемия со средним значением общего холестерина до $5,97 \pm 0,27$ (95% ДИ 4,39—6,58) ммоль/л, умеренная гепатомегалия и стеатоз печени, по результатам УЗИ. Данным больным при отсутствии маркеров HBV- HCV-инфекции и указаний на отсутствие употребления алкоголя диагностирована неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), протекающая в рамках метаболического синдрома Х, протекающего в полиморбидности с сахарным диабетом ($n = 67$, 57,8%), артериальной гипертензией ($n = 112$, 96,5%) и ИБС ($n = 85$, 73,3%). К особенностям неалкогольного стеатогепатита, протекающего в коморбидности с туберкулёзом, можно отнести самые низкие параметры маркеров цитолиза и мезенхимального воспаления, нормальные значения маркеров печеночно-клеточной недостаточности и самые низкие параметры желтухи и холестаза.

Лекарственный гепатит развивался в ответ на воздействия противотуберкулёзной полихимиотерапии в 2,2% случаев — у 58 из 2643 больных туберкулёзом. Клинические особенности лекарственного гепатита у больных туберкулёзом — нарастание слабости, появление диспепсии — тошноты, рвоты, а также желтухи и кожного зуда, гепатомегалии, цитолиза, холестаза, гипербилирубинемии, что согласуется с данными литературы [24].

Таким образом, хронический гепатит сопутствует туберкулёзу различных локализаций в каждом втором (45%) случае, причём лёгочному туберкулёзу в 3,4 раза чаще, чем внелёгочному ($p = 0,001$) и в 1,7 раза чаще, чем абдоминальному ($p = 0,005$). Хронический гепатит у больных туберкулёзом в половине случаев (53,2%) встречается в стадии обострения независимо от локализации туберкулёзного процесса.

Больные хроническим гепатитом, коморбидным с туберкулёзом, — преимущественно мужчины молодого возраста (38,3—40,7 года).

В структуре хронического гепатита, протекающего в коморбидности с туберкулёзом, 59,6% принадлежит HCV- и HBV-инфекции, преимущественно (91,9%) HCV-инфекции, четверть — 25,7% — алкогольному стеатогепатиту. В каждом десятом случае (9,8%) хронический гепатит, коморбидный с туберкулёзом, протекает в рамках неалкогольной жировой болезни печени, а в 4,9% случаев встречается лекарственный гепатит. Вирусный гепатит С и В выявляют одинаково часто при лёгочном, внелёгочном и абдоминальном туберкулёзе.

Алкогольный стеатогепатит также одинаково представлен в структуре хронического гепатита, коморбидного с лёгочным, внелёгочным и абдоминальным туберкулёзом.

Неалкогольная жировая болезнь печени, протекающая в рамках метаболического синдрома, занимает 9,8% случаев хронического гепатита, коморбидного с туберкулёзом. Она встретила с одинаковой частотой в структуре хронического гепатита, коморбидного с туберкулёзом органов дыхания, внелёгочным и абдоминальным туберкулёзом.

Лекарственный гепатит, занимающий в структуре хронического гепатита, коморбидного с туберкулёзом, 4,9% случаев, диагностирован у больных хроническими формами туберкулёза органов дыхания.

Клиническими особенностями хронического вирусного гепатита, протекающего в коморбидности с туберкулёзом, являются его малосимптомность с незначительными паренхиматозной желтухой, цитолизом, и более ярким мезенхимальным воспалением — гепатомегалией, печеночно-клеточной недостаточностью при его коморбидности с абдоминальным туберкулёзом.

Особенности клиники алкогольного стеатогепатита, протекающего в коморбидности с туберкулёзом, — выраженные печеночно-клеточная недостаточность, более высокие цитолиз, желтуха и холестаза.

Неалкогольный стеатогепатит в коморбидности с туберкулёзом протекает на фоне квартета метаболического синдрома Х, характеризуется наиболее низкими параметрами маркеров цитолиза, мезенхимального воспаления, желтухи, холестаза, отсутствием повышения маркеров печеночно-клеточной недостаточности.

Хронический вирусный и неалкогольный стеатогепатит, протекающие в коморбидности с туберкулёзом, характеризуются превалированием холестаза и желтухи на фоне абдоминального туберкулёза.

Выводы:

1. Хронический гепатит диагностируют в 45% госпитальных случаев туберкулёза, в том числе: лёгочных — 48,2%, внелёгочных — 14,2% и абдоминальных 28,6% локализаций.

2. В структуре хронического гепатита, протекающего в коморбидности с туберкулёзом, половину (59,6%) занимает хронический вирусный гепатит; четверть (25,7%) — алко-

гольный стеатогепатит; 9,8% — неалкогольный стеатогепатит, 4,9% принадлежит лекарственному гепатиту.

3. Частота хронического вирусного, алкогольного, а также неалкогольного стеатогепатита, протекающего в рамках метаболического синдрома, одинакова в структуре лёгочного, внелёгочного и абдоминального туберкулёза. Лекарственный гепатит регистрируют при его коморбидности с хроническими формами туберкулёза органов дыхания.

4. Клиническими особенностями хронического гепатита, коморбидного с туберкулёзом, является преимущественно низкая и умеренная степень его лабораторной активности; преобладание мезенхимального воспаления, желтухи и холестаза при коморбидности с абдоминальным туберкулёзом.

5. Хронический гепатит С и В и неалкогольный стеатогепатит, протекающие в коморбидности с туберкулёзом, отличаются малосимптомностью клиники и более яркое мезенхимальное воспаление (гепатомегалия, пенично-клеточная недостаточность) при его коморбидности с абдоминальным туберкулёзом.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3—6, 10—14, 20
см. REFERENCES)

1. Белялов Ф.И., ред. *Лечение внутренних болезней в условиях коморбидности*. Монография. Иркутск: РИО ИГИУВа; 2011.
2. Пальгова Л.К., Прашнова М.К., Райхельсон К.Л., Барановский А.Ю. Врачебная практика при сочетанной патологии: ассоциированные с приемом нестероидных противовоспалительных препаратов поражения желудочно-кишечного тракта. *Лечащий врач*. 2014; 3: 69—74.
3. Крылов А.А. К проблеме сочетаемости заболеваний. *Клиническая медицина*. 2000; 78(1): 56—9.
4. Лазебник Б.Л., Лычкова А.Э., Михайлова З.Ф. Полиморбидность при воспалительных заболеваниях кишечника. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 153(1): 35—8.
5. Нургазизова А.К. Происхождение, развитие и современная трактовка понятий «коморбидность» и «полиморбидность». *Казанский медицинский журнал*. 2014; 95(2): 292—6.
6. Ивашкин В.Т., ред. *Диагностика и лечение неалкогольной болезни печени. Методические рекомендации для врачей*. М.: РОПИТ; 2015.
7. Звенигородская Л.А. Неалкогольная жировая болезнь печени: эволюция представлений, патогенетические акценты, подходы к терапии. *Трудный пациент*. 2015; 13(10-11): 37—43.
8. Семендяева М.Е. Неалкогольная жировая болезнь печени как медицинская и социальная проблема. *Клиническая практика*. 2012; 71—80. <http://clinpractice.ru>
9. Ивашкин В.Т., Юшук Н.Д., ред. *Рекомендации по диагностике и лечению взрослых больных гепатитами В и С*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015.
10. Chalasani N., Younossi Z., Lavine J.E. et al. Практическое руководство: диагностика и лечение неалкогольной жировой болезни печени (2012). *Здоров'я України. Hepatology*. 2012; 55 (6): 2005—23.
11. Барканова О.Н., Гагарина С.Г., Калуженина А.А., Попкова Н.Л. Вопросы клиники и диагностики туберкулёза печени и селезенки. *Лекарственный вестник*. 2015; 9 (2; 58): 33—7.
12. Зырянова Т.В., Поддубная Л.В., Федорова М.В., Липский К.А. Туберкулёз органов брюшной полости у больных туберкулёзом легких. *Медицина и образование в Сибири*. 2009; 2. http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=370/
13. Смотриш С.М., Гаврилик Б.Л. Хирургические осложнения абдоминального туберкулёза. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2011; 3: 69—70.
14. Мадасова В.Г., Аксенова А.В. Опыт применения гепатопротекторов при лечении детей и подростков, больных туберкулёзом. *Лечащий врач*. Выпуск 02/08-29. <http://www.lvrach.ru/2008/02/4830571/>

REFERENCES

1. Belyalov F.I., ed. *Treatment of internal diseases in terms of comorbidity [Lechenie vnutrennikh boleznei v usloviyakh komorbidnosti]*. Monographiya. Irkutsk: RIO IGIUVa; 2011. (in Russian)
2. Pal'gova L.K., Prashnova M.K., Rajhel'son K.L., Baranovskij A.Ju.

- Practice with comorbidity: lesions of the gastrointestinal tract associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Lechaschij vrach*. 2014; 3: 69—74. (in Russian)
3. Hahn R. Multimorbidity in the elderly in a geriatric hospital. *Pharmacophychiatry*. 2003; 36.
4. Starfield B., Lemke K.W., Bernhardt T. et al. Comorbidity: Implications for the Importance of Primary Care in 'Case' Management. *Ann. Fam. Med.* 2003; 1(1): 8—14.
5. Starfield B. Threads and yarns: weaving the tapestry of Comorbidity. *Ann. Fam. Med.* 2006; 4(2): 101—3.
6. Valderas J.M., Starfield B., Roland M. Multimorbidity's many challenges: a research priority in the UK. *BMJ*. 2007; 334: 1016—7.
7. Krylov A.A. On a problem of the compatibility of diseases. *Klinicheskaya meditsina*. 2000; 78(1): 56—9. (in Russian)
8. Lazebnik B.L., Lychkova A.Je., Mihajlova Z.F. Polymorbidity in inflammatory bowel diseases. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2012; 153(1): 35—8. (in Russian)
9. Nurgazizova A.K. The origin, development and current concepts of «comorbidity» and «polimorbidity». *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2014; 95(2): 292—6. (in Russian)
10. Fortin M., Lapointe L., Hudon C., Vanasse A., Antoine L. Multimorbidity and quality of life in primary care: a systematic review. *Health and Quality of Life Outcomes*. 2004; 2: 2—51.
11. De Groot V., Beckerman H., Lankhorst G., Bouter L.M. How to measure comorbidity: a critical review of available methods. *J. Clin. Epidemiol.* 2003; 56: 221—9.
12. Sevenoaks M.J., Stockley R.A. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, inflammation and co-morbidity — a common inflammatory phenotype? *Respir. Res.*; 7: 70.
13. Schoenberg N.E., Kim H., Edwards W., Fleming S.T. Burden of Common Multiple-Morbidity Constellations on Out-of-Pocket Medical Expenditures among Older Adults. *Gerontologist*. 2007; 47: 423—37.
14. Soriano J.B., Visick G.T., Muellerova H. et al. Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care. *Chest*. 2005; 128(4): 2099—2107.
15. Ivashkin V.T., ed. *Diagnosis and treatment of non-alcoholic liver disease. Guidelines for Doctors [Diagnostics i lechenie nealkogol'noj bolezni pecheni. Metodicheskie rekomendatsii dlya vrachei. Guidelines for Doctors]*. Moscow: ROPIT; 2015. (in Russian)
16. Zvenigorodskaja L.A. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Evolution of Concepts, Pathogenetic Accents Approaches to Therapy. *Trudnyi patsient*. 2015; 13(10-11): 37—43. (in Russian)
17. Semendyaeva M.E. Non-alcoholic fatty liver disease as a medical and social problem. *Klinicheskaya praktika*. 2012; 71—80. <http://clinpractice.ru>. (in Russian)
18. Ivashkin V.T., Yushhuk N.D., eds. *Recommendations for the diagnosis and treatment of adult patients with hepatitis B and C. [Rekomendatsii po diagnostike i lecheniju vzroslykh bol'nyh gepatitami B i C]*. Moscow: GEOTAR Media. A series of «Clinical Guidelines», 2015; 144: III. (in Russian)
19. Chalasani N., Younossi Z., Lavine J.E. et al. Manual: diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease (2012). *Zdorov'ja Ukraini. Hepatology*. 2012; 55(6): 2005—23. (in Russian)
20. Recommendation for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C / Visit the HCV Guidance website to access the most up-to-date version. Updated: February 24, 2016. <http://live-hcv-guidance-new.gotpantheon.com>.
21. Barkanova O.N., Gagarina S.G., Kaluzhenina A.A., Popkova N.L. Questions on Clinic picture and diagnosis of tuberculosis of the liver and spleen. *Lekarstvennyi vestnik*. 2015; 9 (2; 58): 33—7. (in Russian)
22. Zyryanova T.V., Poddubnaya L.V., Fedorova M.V., Lipskij K.A. Tuberculosis of the abdominal cavity in patients with pulmonary tuberculosis. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri*. 2009; 2. http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=370/ (in Russian)
23. Smotrin S.M., Gavrilik B.L. Surgical complications of abdominal tuberculosis. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2011; 3: 69—70. (in Russian)
24. Madasova V.G., Aksenova A.V. Experience with hepatic protectors in the treatment of children and adolescents suffering from tuberculosis. *Lechaschij vrach*. Vypusk 02/08-29. <http://www.lvrach.ru/2008/02/4830571/> (in Russian)

Поступила 11.04.17

Принята к печати 15.04.17

ОСОБЕННОСТИ РЕДОКС-СТАТУСА ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО ЗВЕНА ЭРИТРОНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЯХ НЕОПЛАЗМЫ ОРГАНОВ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СФЕРЫ

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», 432017, Ульяновск, Российская Федерация

С целью оценки особенностей редокс-статуса в эритроцитах периферической крови больных раком яичников, раком тела матки и раком шейки матки оценивали продукты перекисного окисления липидов: диеновые конъюгаты, кетодиены, шиффовы основания по Волчегорскому, малоновый диальдегид по Л.И. Андреевой, содержание продуктов окислительной модификации белков по Е.Е. Дубининой; активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутаза по Nishikimi, каталаза, глутатион-S⁻-трансфераза, глутатионредуктаза и уровень восстановленного глутатиона — по А.И. Карпищенко. Оценку архитектоники эритроцитов и ригидности мембраны проводили с использованием сканирующего зондового микроскопа SolverPro (NT-MDT, Зеленоград, Россия). Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна—Уитни. Установлено увеличение продуктов начальных стадий перекисного окисления липидов — диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, и снижение уровня промежуточных (кетодиенов) и третичных (шиффовых оснований) продуктов перекисного окисления липидов. На этом фоне имело место разнонаправленное изменение супероксиддисмутазы и снижение каталазы. Одновременно отмечено повышение активности глутатион-трансферазы и уровня восстановленного глутатиона при всех изученных локализациях неоплазмы. Уровень продуктов окислительной модификации белков зависел от места локализации первичной опухоли и был минимальным при раке шейки матки. Также установлено изменение цитоархитектоники эритроцитов: образование обратимо деформированных эхиноцитов у пациентов при раке яичников и необратимо деформируемых сфероцитов — у пациентов при раке шейки матки и раке тела матки, а также резкое возрастание ригидности мембраны эритроцитов. Полученные данные позволяют предполагать в качестве паранеопластических процессов возникновение в эритроцитах периферической крови больных раком яичников, раком шейки матки и раком тела матки на распространенной стадии заболевания окислительного и карбонильного стресса, сопровождающегося образованием эхиноцитов и сфероцитов и значимым возрастанием ригидности мембраны. Однако выраженность этих процессов определяется локализацией первичной неоплазмы и может быть использована для характеристики биологического портрета опухоли при рассмотрении схем антиоксидантной терапии.

Ключевые слова: эритроциты; перекисное окисление липидов; окислительная модификация белков; цитоархитектоника; ригидность; рак яичников; рак шейки матки; рак тела матки.

Для цитирования: Генинг Т.П., Федотова А.Ю., Долгова Д.Р., Абакумова Т.В., Антонеева И.И. Особенности редокс-статуса периферического звена эритрона при различных локализациях неоплазмы органов женской репродуктивной сферы. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (8): 468-472. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-468-472>

Gening T.P., Fedotova A.Iu., Dolgova D.R., Abakumova T.V., Antonieva I.I.

THE CHARACTERISTICS OF REDOX-STATUS OF PERIPHERAL PART OF ERYTHRON UNDER VARIOUS LOCALIZATIONS OF NEOPLASM OF ORGANS OF FEMALE REPRODUCTIVE SPHERE

The Ulyanovskii state university, 432017 Ulyanovsk, Russia

The study was carried out to evaluate characteristics of redox-status in erythrocytes of peripheral blood of patients with ovarian cancer, uterine body cancer and cervix cancer using evaluation of products of peroxide oxidation of lipids: diene conjugates, ketodienes, Schiff's bases by Volchegorskii, malonic di-aldehyde by L.I. Andreieva, content of products of oxidizing modification of proteins by E.E. Dubinina; activity of anti-oxidant enzymes: superoxiddismutase by Nishikimi, catalase, glutathione-S⁻-transferase, glutathionereductase and level of reduced glutathione by A.I. Karpischenko. The evaluation of architectonics of erythrocytes and rigidity of membrane was implemented using a scanning probing microscope SolverPro (NT-MDT, Zelenograd, Russia). The statistical processing of obtained data was implemented using non-parametric Mann-Whitney U-test. The increasing of products of initial stages of peroxide oxidation of lipids - diene conjugates and malonic di-aldehyde and decreasing of level of interim (ketodienes) and tertiary (Schiff's bases) products of peroxide oxidation of lipids have been established. Against this background a multi-directional alteration of superoxiddismutase and decreasing of catalase occurred. Simultaneously, increasing of activity of glutathione-transferase and level of reduced glutathione under all analyzed localizations of neoplasm were noted. The level of products of oxidizing modification of proteins depended on localization of primary tumor and it was minimal in case of cervix cancer. Also such an alteration of cyto-architectonics of erythrocytes was established as development of reversible deformed echinocytes in patients in case of ovarian cancer and irreversible deformed spherocytes in patients with cervix cancer and uterine body cancer and also abrupt increasing of rigidity of membrane of erythrocytes. The obtained data permits to surmise as a capacity of para-neoplastic processes development of oxidative and carbonyl stress in erythrocytes of peripheral blood of patients with ovarian cancer, cervix cancer and uterine body cancer at extensive stage of disease. The mentioned stress is accompanied by formation of echinocytes and spherocytes and significant increasing of rigidity of membrane. However, intensity of these processes is determined by localization of primary neoplasm and it can be applied for characteristic of biological portrait of tumor in case of consideration of schemes of anti-oxidant therapy.

Keywords: erythrocytes; peroxide oxidation of lipids; oxidative modification of proteins; cyto-architectonics; rigidity; ovarian cancer; cervix cancer; uterine body cancer

For citation: *Gening T.P., Fedotova A.Iu., Dolgova D.R., Abakumova T.V., Antoneeva I.I. The characteristics of redox-status of peripheral part of erythron under various localizations of neoplasm of organs of female reproductive sphere. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (8): 468-472. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-468-472>*

For correspondence: *Gening T.P.*, doctor of biological sciences, professor, the head of the chair physiology and pathophysiology. e-mail: Naum-53@yandex.ru

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

Acknowledgment. *The study was supported by state target of the Ministry of Education and Science of Russia.*

Received 30.03.2017
Accepted 10.04.2017

Нарушения морфофункциональных свойств эритроцитов циркулирующей крови организма-опухоленосителя установлены при опухолях различной локализации. Показаны нарушения белкового состава и липидного спектра мембраны эритроцитов, изменения параметров транспортных систем [1—3]. При этом морфофункциональные нарушения эритроцитов постулируются как однонаправленные и неспецифические признаки влияния неоплазмы [4], хотя предполагается, что степень их выраженности зависит от локализации опухоли [5]. Целью исследования была оценка особенностей редокс-статуса эритроцитов периферической крови больных раком яичников (РЯ), раком тела матки (РТМ) и раком шейки матки (РШМ).

Материал и методы. Объектом исследования послужили эритроциты периферической крови первичных пациенток: 25 больных РЯ III стадии по FIGO, 25 больных РШМ IIb—IV стадии по FIGO и 20 — РТМ II стадии по FIGO. Подбор пациенток проводили по строго определенным критериям: возраст 48—60 лет (включительно); отсутствие острых воспалительных заболеваний, отсутствие в анамнезе хирургических вмешательств давностью менее года (включая стоматологические). Больные были обследованы в гинекологическом отделении Ульяновского областного клинического онкологического диспансера. В контрольную группу вошли 20 здоровых женщин.

Для оценки системы «перекисное окисление липидов—антиоксиданты» (ПОЛ-АО) в эритроцитах определяли уровень диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов (КД), шиффовых оснований (ШО) по интенсивности поглощения при длинах волн 220, 232, 278 и 400 нм соответственно в гептановом экстракте по методу И.А. Волчегорского [6]. Уровень малонового диальдегида (МДА) определяли в тесте с тиобарбитуровой кислотой по методу Л.И. Андреевой и соавт. [7]. Содержание продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) оценивали при 346, 370, 430, 530 нм по методу Е.Е. Дубининой [8]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали по способности конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидный анион по методу М. Nishikimi [9]. Активность каталазы оценивали по определению скорости утилизации H_2O_2 по методу А.И. Карпищенко [10]. Активность глутатион-S-трансферазы (ГТ) оценивали по скорости ферментативного образования GS-2,4-динитробензола в катализируемой ферментом реакции восстановления глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом по методу А.И. Карпищенко [10]. Активность глутатион-редуктазы (ГР) и уровень восстановленного глутатиона (GSH) определяли также по методу А.И. Карпищенко [10]. Сканирование препаратов крови проводилось на сканирующем зондовом микроскопе SmenaA (NT-MDT, Зеленоград, Россия) в полуконтактном режиме, использовали фирменные кремниевые зонды с жесткостью 0,2 N/m, радиус закругления кончика зонда примерно 50 нм. Во всех исследуемых группах оценена топология и ригидность мембраны по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца по силовым кривым $dfl(Z)$, где dfl — отклонение кантилевера от заданного положения, а Z — координата положения кантилевера по вертикали относительно образца. Статистическую значимость полученных результатов оценивали с помощью

непараметрического критерия Манна—Уитни. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. В результате проведенных исследований нами установлено значимое по сравнению с контролем и в равной степени выраженное при РЯ, РТМ и РШМ увеличение уровней МДА и ДК и снижение уровней КД и ШО (таблица).

А вот активность ферментов антиоксидантной системы (АОС) в эритроцитах изменялась различно по отношению к контролю в зависимости от локализации опухоли. Активность ГТ была повышена по сравнению с контролем при всех изученных локализациях неоплазмы (см. таблицу). Наиболее выраженное повышение отмечено при РЯ.

Активность каталазы была резко и значимо снижена при всех изученных локализациях неоплазмы. При этом показатель при РШМ почти в 4 раза превышал таковой при РЯ. Активность СОД, повышенная при РЯ, оставалась на уровне контроля при РШМ и РТМ. Активность фермента ГР была повышена при РЯ и РТМ и значимо не изменялась при РШМ (см. таблицу).

Установленное в наших исследованиях повышение уровня GSH в эритроцитах больных РЯ, РШМ и РТМ может, видимо, свидетельствовать об активации тиолдисульфидной системы на распространенной стадии развития неоплазмы указанных локализаций.

Уровень продуктов ОМБ в эритроцитах организма-опухоленосителя также зависел от места локализации первичной опухоли: уровни альдегидных ($\lambda = 346$ нм) и кетонных ($\lambda = 370$ нм) групп нейтрального характера не отличались от контроля при РЯ и РТМ и значимо понижались при РШМ, а уровни карбонильных производных основного характера ($\lambda = 430$ и 530 нм) повышались при РЯ, понижались при РШМ и имели разнонаправленную динамику при РТМ (см. таблицу).

На рис. 1, 2 (см. обложку) представлены: топология, боковое сечение и изображение в 3D эритроцитов доноров и больных РШМ. При сканировании образцов эритроцитов доноров обнаруживаются нормоциты с типичной дисковидной формой. У пациенток с опухолевым процессом цитоархитектоника эритроцитов меняется. При этом у пациенток с РЯ появляются обратимо деформированные формы-эхиноциты. Их появление связано с изменением ионной проницаемости, нарушением работы ионных каналов. У больных с РТМ и РШМ практически все эритроциты представляют собой сфероциты. Они могут быть неправильной формы с измененными линейными размерами. Сфероциты увеличивают внутрисосудистый гемолиз, что приводит к гипоксии в организме-опухоленосителе.

Также установлено, что ригидность мембраны эритроцитов в организме-опухоленосителе значимо выше таковой в интактном организме (см. таблицу).

Обсуждение. Эритроциты периферической крови при опухолях всех рассмотренных локализаций характеризуются значимо, по сравнению с контролем, увеличенными уровнями первичных (ДК) и вторичных (МДА) и сниженными уровнями промежуточных (КД) и третичных (ШО) продуктов ПОЛ. Таким образом, полученные данные подтверждают

Изменение редокс-зависимых показателей в эритроцитах у больных с онкогинекологической патологией

Показатели	липерпероксидация				ОМБ				GSH, ммоль/л	ГР, ммоль/ мин/л	ГТ, ммоль/ мин/л	Каталаза, ммоль/ мин/л	СОД, усл. ед.	Ригидность, МПа
	МДА, мкмоль/л	ДК	КД	ШО	346 нм	370 нм	430 нм	530 нм						
Контрольная группа (n = 20)	325,80 ± 17,23	0,547 ± 0,031	0,121 ± 0,011	0,032 ± 0,005	1,24 ± 0,06	1,252 ± 0,056	0,706 ± 0,048	0,368 ± 0,028	0,401 ± 0,011	1,008 ± 0,032	0,429 ± 0,023	8,796 ± 0,875	0,827 ± 0,036	78,87 ± 3,26
РЯ (n = 25)	449,01 ± 29,02*	0,944 ± 0,029*	0,074 ± 0,011*	0,016 ± 0,005	1,353 ± 0,106	1,370 ± 0,074	0,854 ± 0,029	0,501 ± 0,035	0,554 ± 0,033	0,845 ± 0,094	0,621 ± 0,058	7,602 ± 1,121	1,660 ± 0,423	162,10 ± 4,49*
РШМ (n = 25)	485,60 ± 47,31*	1,020 ± 0,005*	0,087 ± 0,001	0,0025 ± 0,0003*	0,865 ± 0,045*	1,064 ± 0,056	0,642 ± 0,031	0,174 ± 0,009*	0,978 ± 0,072*	0,057 ± 0,006*	0,344 ± 0,031	30,480 ± 5,156*	0,773 ± 0,096	159,40 ± 4,04*
РТМ (n = 20)	429,91 ± 21,54*	1,017 ± 0,009*	0,094 ± 0,002	0,0026 ± 0,0006*	1,059 ± 0,053	1,301 ± 0,063	0,780 ± 0,035	0,214 ± 0,011	0,778 ± 0,044	0,722 ± 0,048	0,412 ± 0,029	9,612 ± 0,685	0,722 ± 0,044	106,60 ± 2,56*

Примечание. * — данные статистически значимо отличаются от аналогичных данных в контрольной группе.

существующую точку зрения, что активация свободнорадикального окисления — типовая реакция циркулирующей эритроцитарной популяции на наличие в организме неоплазмы [3].

ПОЛ — это каскад свободнорадикальных цепных реакций, когда образовавшийся радикал инициирует образование нескольких других. В мембранах основным субстратом ПОЛ является арахидоновая кислота. Иницирует реакцию, как правило, гидроксильный радикал, отнимающий водород в α-положении по отношению к двойной связи, что приводит к перемещению этой двойной связи с образованием ДК [11]. ДК и КД на 2-й стадии окисления распадаются до альдегидов и кетонов. Один из продуктов — МДА. Это вторичные продукты ПОЛ. Они, взаимодействуя с аминокетонами фосфолипидов и белков, образуют полимерные соединения, называемые основаниями Шиффа. Это — конечные продукты ПОЛ. Полученные нами результаты позволяют предполагать, что развитие неоплазмы рассмотренных локализаций инициирует в эритроцитах периферической крови начальные стадии ПОЛ, повышая в них уровень ДК и МДА.

Развитие цепи свободнорадикальных реакций останавливается в частности при участии ферментов АОС. Ведущее место среди них занимает СОД, которая катализирует реакцию дисмутации O_2^- с образованием H_2O_2 , каталаза, восстанавливающая H_2O_2 , ГПО и ГТ, удаляющие органические перекиси. При этом СОД рассматривают как ключевое звено в регуляции постоянной концентрации O_2^- в клетке, а удаление O_2^- необходимо для защиты внутриклеточного GSH от окисления. Увеличение активности СОД, адекватное усиление ПОЛ мы установили только в эритроцитах больных РЯ. В эритроцитах больных РШМ и РТМ активность СОД оставалась на уровне контроля. Одновременное с СОД действие каталазы эффективнее защищает клетки от окислительного стресса, чем каждый фермент по отдельности. Однако мы отметили значимое снижение активности каталазы в эритроцитах больных всех изученных локализаций неоплазмы. Ганс Селье, один из основоположников учения о стрессе, выявил снижение уровня глутатиона в крови животных на фоне введения АКГГ.

Результаты более поздних исследований в эксперименте и в клинике подтвердили снижение концентрации SH-групп крови при развитии в организме неоплазмы [12]. Согласно теории В.В. Соколовского [13], тиолы, существующие в клетке в восстановленной и окисленной формах, изменяют соотношение этих форм при внешнем или внутреннем воздействии. Эти изменения носят фазовый характер: вначале — увеличение восстановленной формы (активация), затем — снижение ее количества (истощение).

С участием тиолдисульфидной системы реализуется

редокс-сигнализация в клетке. Показано, что окисляющие условия поддерживаются на наружной поверхности клеточной мембраны дисульфидами (-SS-), а восстановленное состояние внутри клетки — (SH) свободными сульфгидрильными группами. Указанное равновесие поддерживается резервом антиоксидантов. Компонентами глутатионовой редокс-системы, помимо GSH и GSSG, являются ГТ и ГР.

Основная функция представителей семейства ГТ — защита клеток от ксенобиотиков и продуктов ПОЛ. Последние могут присоединяться к глутатиону [14, 15]. ГТ не взаимодействует с H_2O_2 , но восстанавливает гидроперекиси линолевой и арахидоновой кислот и мононуклеотидов, а также конъюгирует продукты ПОЛ с GSH с последующим выведением их из клетки. Увеличение активности ГТ в наших исследованиях также имело место в эритроцитах больных всех рассмотренных локализаций. GSSG восстанавливается с участием НАДФ и ГР, которая локализуется в митохондриях и/или в цитозоле. ГР «нарабатывает» GSH и активность её, определяемая в наших исследованиях, в эритроцитах больных РЯ и РТМ была выше, а у больных РШМ не отличалась значимо от контроля. Таким образом, полученные нами результаты позволяют предполагать, что в эритроцитах пациенток с РЯ, РТМ и РШМ на распространенной стадии заболевания глутатионовая система антирадикальной защиты переходит на более высокий уровень функционирования [16], что согласуется с данными ряда авторов [17—19], на фоне блока компонентов ферментативного звена антиоксидантной системы.

Показатель состояния этой тиолдисульфидной системы может быть использован для оценки окислительного стресса (ОС), в том числе и при развитии в организме неоплазмы [19].

Эритроциты человека были одной из модельных систем, на которых изучали уровни карбонильных окисленных белков. Показано, что повышение этого уровня служит одним из наиболее ранних и устойчивых показателей ОС [8].

Усиление ОМБ показано при различных патологических состояниях, в том числе и при неопластических процессах [20—22]. Возможно, уровни альдегидных и кетонных групп нейтрального характера не отличались значимо от контроля при РЯ и РТМ. Существует мнение, что образующиеся на начальных стадиях комплексы окисленных липидов с реактивными группами белков ингибируют ОМБ в системах, включающих железо и H_2O_2 . В дальнейшем защитная роль этих комплексов снижается, и окислительные белки накапливаются [23]. Это позволяет предполагать различные стадии карбонильного стресса в эритроцитах больных с распространенным опухолевым процессом, но с разной локализацией неоплазмы. Деформируемость эритроцитов определяет реологические свойства крови.

Она (деформируемость) характеризуется значительной

вариабельностью формы эритроцитов при взаимодействии друг с другом и зависит от 3 основных факторов: эластичности мембраны, внутренней вязкости содержимого клеток, отношения поверхности клеток к их объему. Эластичность мембраны эритроцитов определяется состоянием липидных компонентов, концентрацией гемоглобина, АТФ и ионов Ca^{2+} . Помимо эластичности мембран, в определении механических свойств имеет значение их внутренняя вязкость, вторая зависит от концентрации кальция [24]. Вступая в реакцию с внутриклеточными белками при связывании с мембраной, кальций повышает ригидность эритроцита. Интерес к изучению деформируемости эритроцитов обусловлен тем, что ригидные эритроциты способны окклюзировать часть капиллярного русла и таким образом блокировать кровообращение в системе микроциркуляции. Основной причиной снижения деформационной способности эритроцитов [25] считают гипоксическое состояние организма. У больных с хронической гипоксией форма эритроцитов оказывается значительно измененной: снижается количество дискоцитов, увеличивается число сфероцитов, появляются эритроциты в виде вздутого диска шиповидной формы — эхиноциты. Нарушение структуры и функции мембран при хронической гипоксии обусловлено активацией системы перекисного окисления липидов (ПОЛ), которая является неспецифическим ответом на многочисленные экзогенные воздействия. Активация ПОЛ влечет глубокие нарушения мембранной структуры, образование липид-липидных и липид-белковых межмолекулярных «сшивок», что приводит к изменению физико-химических свойств липидного матрикса, пассивной ионной проницаемости мембраны. Доказана связь между деформируемостью, механической стойкостью, временем жизни эритроцитов и интенсивностью липопероксидации [26].

Заключение. Полученные данные позволяют предполагать в качестве паранеопластических процессов возникновение в эритроцитах периферической крови больных РЯ, РШМ и РТМ на распространенной стадии заболевания оксидативного и карбонильного стресса, сопровождающегося образованием эхиноцитов и сфероцитов и значимым возрастанием ригидности мембраны. Однако выраженность этих процессов определяется локализацией первичной неоплазмы и может быть использована для характеристики биологического портрета опухоли при рассмотрении схем антиоксидантной терапии.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке государственного задания Министерства образования и науки РФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (pp. 9, 15, 23—26 см. REFERENCES)

1. Крыжановский Г.Н. *Дизрегуляторная патология*. М: Медицина; 2002.
2. Новицкий В.В., Степовая Е.А., Гольдберг В.Е., Колосова М.В., Рязанцева Н.В., Корчин В.И. *Эритроциты и злокачественные новообразования*. Томск: STT; 2000.
3. Чеснокова Н.П., Барсуков В.Ю., Понукалина Е.В., Агабеков А.И. Закономерности изменений процессов свободнорадикальной дестабилизации биологических мембран при аденокарциноме восходящего отдела ободочной кишки, их роль в развитии опухолевой прогрессии. *Фундаментальные исследования*. 2015; 1: 164—8.
4. *Дизрегуляторная патология системы крови*. Гольдберг Е.Д., Крыжановский Г.Н., ред. М.: «Медицинское информационное агентство»; 2009.
5. Степовая Е.А., Гольдберг В.Е., Новицкий В.В. Поверхностная архитектура эритроцитов периферической крови у больных раком легкого. *Лабораторное дело*. 1991; 6: 29—31.
6. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропаноловых экстрактах крови. *Вопросы медицинской химии*. 1989; 1: 127—31.
7. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой. *Лабораторное дело*. 1988; 11: 41—3.
8. Дубинина Е.Е. *Продукты метаболизма кислорода в функциональ-*

ной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение): физиологические и клинико-биохимические аспекты. СПб.: Медицинская пресса; 2006.

10. Карпищенко А.И. *Медицинские лабораторные технологии и диагностика*. Справочник: Т. 2. СПб.: Интермедика; 1999.
11. Чеснокова Н.П. *Типовые патологические процессы*. Саратов: Издательство Саратовского медицинского университета; 2004.
12. Пашов А.И., Цхай В.Б., Гребенников Э.К., Сивова Е.Н. Оксидантный стресс и глутатионовая редокс-система в канцерогенезе. *Мать и Дитя в Кузбассе*. 2012; 3: 3—8.
13. Соколовский В.В. *Тиол-дисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма*. СПб, 1996.
14. Зенков Н.К., Ланкин В.В., Меньшикова Е.Б. *Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты*. М.; 2001.
16. Лю Б.Н., Лю М.Б., Исмаилов Б.И. Роль митохондрий в развитии и регуляции уровня окислительного стресса в норме, при клеточных патологиях и реверсии опухолевых клеток. *Успехи современной биологии*. 2006; 126(4): 388—98.
17. Сурикова Е.И., Сергеева М.М., Горошинская И.А., Максимова Н.А., Шалашная Е.В. Состояние антиоксидантной системы эритроцитов и содержание гаптоглобина в крови больных раком яичников с различной васкуляризацией локальной рецидивной опухоли. *Современные проблемы науки и образования*. 2012; 2: 21.
18. Неродо Г.А., Горошинская И.А., Иванова В.А., Сурикова Е.И., Качесова П.А., Шалашная Е.В., Неродо Е.А., Немашкалова Л.А., Леонова А.В. Исследование состояния перекисного окисления липидов у больных раком вульвы. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014; 8: 62—6.
19. Герасименко М.Н., Титова Н.М., Зуков Р.А., Дыхно Ю.А., Переток Е.С. Перекисное окисление липидов и состояние антиоксидантной системы в эритроцитах больных раком почки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 154(12): 692—4.
20. Артемьева С.С., Близначева Г.Н., Мухаммед З.Д. Окислительная модификация белков и генерация супероксиданиона при ожоговом стрессе у крыс. *9-я Международная Пушчинская школа — конференция молодых ученых «Биология — наука XXI века*». Пушчино-на-Оке; 2002: 56.
21. Дубровская М.Д., Кличханов Н.К., Исмаилова Ж.Г. Влияние искусственной гипотермии на степень окислительной модификации белков плазмы крови сусликов. *Вестник Дагестанского государственного университета*. 2004; 4: 72—4.
22. Бондаренко Т.И., Сорокина И.А., Майборода Е.А., Дурканаева О.А., Кутилин Д.С., Михалева И.И. Влияние пептида, индуцирующего дельта-сон, на окислительную модификацию белков в тканях и крови крыс при физиологическом старении организма. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 3: 350-4.

REFERENCES

1. Kryzhanovskiy G.N. *Disorders pathology [Dizreguljacionnaja patologija]*. Moscow: Meditsina; 2002. (in Russian)
2. Novitskiy V.V., Stepovaya E.A., Gol'dberg V.E., Kolosova M.B., Ryzanceva N.V., Korchin V.I. *Erythrocytes and malignant neoplasms [Eritrocyty i zlokachestvennye novoobrazovaniya]*. Tomsk: STT; 2000. (in Russian)
3. Chesnokova N.P., Barsukov V.Ju., Ponukalina E.V., Agabekov A.I. Regularities of changes in free radical destabilization processes of biological membranes in cases of ascendens adenocarcinoma and the role of such regularities in neoplastic proliferation development. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2015; 1: 164—8. (in Russian)
4. Gol'dberg E.D., Kryzhanovskiy, eds. *Disregulatory pathology of the blood system [Dizreguljacionnaja patologija sistemy krovi]*. Moscow: «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo»; 2009. (in Russian)
5. Stepovaja E.A., Gol'dberg V.E., Novickij V.V. Surface architectonics of erythrocytes of peripheral blood in patients with lung cancer. *Laboratornoe delo*. 1991; 6: 29—31. (in Russian)
6. Volchegorskij V.A., Nalimov A.G., Jarovinskij B.G. Comparison of different approaches to the determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol extracts of blood. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1989; 1: 127—31. (in Russian)
7. Andreeva L.I., Kozhemjakin L.A., Kishkun A.A. Modification of the method for the determination of lipid peroxides in the test with thiobarbituric acid. *Laboratornoe delo*. 1988; 11: 41—3. (in Russian)
8. Dubinina E.E. *Products of oxygen metabolism in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction): physiological and clinical-biochemical aspects. [Produkty metabolizma kisloroda v funkcional'noj aktivnosti kletok]*. St.Peterburg: Meditsinskaya pressa; 2006. (in Russian)
9. Nishikimi M., Appa N., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenacine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972; 46: 849—54.
10. Karpishchenko A.I. *Medical laboratory technologies and diagnostics. Reference book: Vol. 2. [Meditsinskie laboratornye tehnologii i diagnostika. Spravochnik: T. 2]*. St.Peterburg: Intermedika; 1999. (in Russian)

11. Chesnokova N.P. *Typical pathological processes [Tipovye patologicheskie protsessy]*. Saratov: Izdatel'stvo Saratovskogo meditsinskogo universiteta; 2004; (in Russian)
12. Pashov A.I., Chaj V.B., Grebennikova Je.K., Sivova E.N. Oxidative stress and glutathione oxidation-reduction system in the carcinogenesis. *Mat' i Ditya v Kuzbasse*. 2012; 3: 3—8. (in Russian)
13. Sokolovskiy V.V. *Thiol-disulfide ratio of blood as an indicator of the state of nonspecific resistance of the body [Tiol-disul'fidnoe sootnoshenie krovi kak pokazatel' sostojaniya nespecificheskoj rezistentnosti organizma]*. St.Peterburg, 1996; (in Russian)
14. Zenkov N.K., Lankin V.V., Men'shikova E.B. *Oxidative stress. Biochemical and pathophysiological aspects [Okislitel'nyj stress. Biohimicheskie i patofiziologicheskie aspekty]*. Moscow; 2001. (in Russian)
15. Pennant S., Manek S., Kenoe S. Endometrial atypical hyperplasia and subsequent diagnosis of endometrial cancer: a retrospective audit and literature review. *J. Obstet Gynaecol.* 2008; 28: 632—3.
16. Lju B.N., Lju M.B., Ismailov B.I. Rol' mitohondrij v razvitii i reguljacii urovnja oksislitel'nogo stressa v norme, pri kletocnyh patologijah i reversii opuholevyh kletok. *Uspekhi sovremennoj biologii*. 2006; 126(4): 388—98. (in Russian)
17. Surikova E.I., Sergeeva M.M., Goroshinskaja I.A., Maksimova N.A., Shalashnaja E.V. State of antioxidant system of erythrocytes and blood concentration of haptoglobin in ovarian cancer patients with various vascularization of local recurrent tumor. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*. 2012; 2: 21. (in Russian)
18. Nerodo G.A., Goroshinskaja I.A., Ivanova V.A., Surikova E.I., Kachesova P.A., Shalashnaja E.V., Nerodo E.A., Nemashkalova L.A., Leonova A.V. Study of lipid peroxidation status in patients with vulvar cancer. *Mezhdunarodnyj zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovanij*. 2014; 8: 62—6. (in Russian)
19. Gerasimenko M.N., Titova N.M., Zukov R.A., Dyhno Ju.A., Peretoka E.S. Peroxide oxidation of lipids and the state of the antioxidant system in erythrocytes of patients with kidney cancer. *Bulleten' eksperimental'noj biologii i meditsiny*. 2012; 154(12): 692—4. (in Russian)
20. Artem'eva S.S., Bliznecova G.N., Muhammed Z.D. *Oxidative modification of proteins and generation of superoxidation in case of burn stress in rats. [Okislitel'naja modifikacija belkov i generacija superoksidaniona pri ozhogovom stresse u krysa]*. 9-ja Mezhdunarodnaya Pushhinskaya shkola — konferentsiya molodykh uchenykh «Biologija — nauka XXI veka». Puschino-na-Oke; 2002: 56. (in Russian)
21. Dubrovskaya M.D., Klichkhanov N.K., Ismailova Zh.G. The influence of artificial hypothermia on the degree of oxidative modification of proteins of blood plasma of ground squirrels. *Vestnik Dagestanskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2004; 4: 72—4. (in Russian)
22. Bondarenko T.I., Sorokina I.A., Majboroda E.A., Durkanaeva O.A., Kutilin D.S., Mihaleva I.I. Effect of delta sleep-inducing peptide on oxidative modification of proteins in rat tissue and blood during physiological aging. *Byulleten' eksperimental'noj biologii i meditsiny*. 2012; 3: 350—4. (in Russian)
23. Zamora R., Alaiz M., Hidalgo F.J. Feed-Back Inhibition of Oxidative Stress by Oxidized Lipid. *Amino Acid Products. Biochemistry*. 1997; 36: 765—71.
24. Liu F., Mizukami H., Sarnaik S., Ostafin A. Calcium-dependent human erythrocyte cytoskeleton stability analysis through atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* 2005; 150(2): 200—10.
25. Hakim T.S., Macek A.S. Effect of hypoxia on erythrocyte deformability in differentspecies. *Biorheology*. 1988; 25(6): 857—68.
26. Voronova O., Gening T., Abakumova T., Sysolyatin A., Zolotovskiy I., Antoneeva I., Ostatochnikov V., Gening S. The effect of picosecond laser pulses on redox-dependent processes in mice red blood cells studied in vivo. *Progress in Biomedical Optics and Imaging — Proceedings of SPIE*, 2014; 8941.

Поступила 30.03.17
Принята к печати 10.04.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 618.2-07:616.63-074

Кесслер Ю.В., Иванец Т.Ю., Колодько В.Г.

РЕФЕРЕНСНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ МОЧИ ДЛЯ АНАЛИЗАТОРОВ SYSMEX UF 1000I/500I В ДИНАМИКЕ НЕОСЛОЖНЁННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава РФ, 117485, Москва, Россия

На анализаторах Sysmex UF1000i/500i измерены 8 параметров мочи беременных; сформированы верхние референсные значения. Обследованы женщины (n = 158) с неосложнённым течением беременности. Не потребовался расчёт референсных интервалов для лейкоцитов, эритроцитов, плоского и переходного/почечного эпителия, цилиндров (в том числе патологических) — они соответствуют аналогичным значениям для небеременных женщин. Для показателей бактерий и кристаллов были рассчитаны собственные верхние референсные пороги, которые составили в I, II и III триместрах для бактерий 452,8, 687,9 и 571,4 ед./мкл, для солей — 0,59, 0,92 и 0,7 ед./мкл соответственно.

Ключевые слова: анализ мочи; референсные интервалы; беременность; Sysmex UF.

Для цитирования: Кесслер Ю.В., Иванец Т.Ю., Колодько В.Г. Референсные интервалы основных параметров мочи для анализаторов Sysmex UF 1000i/500i в динамике неосложненной беременности. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (8): 472-475. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-472-475>

Kessler Yu.V., Ivanets T.Iu., Kolod'ko V.G.

THE REFERENCE INTERVALS OF MAIN PARAMETERS OF URINE FOR ANALYZERS SYSMEX UF 1000I/500I IN DYNAMICS OF UNCOMPLICATED PREGNANCY

The academician V.I. Kulakov research center of obstetrics, gynecology and perinatology of Minzdrav of Russia, 117485 Moscow, Russia

The analyzer Sysmex UF1000i/500i were used to measure 8 parameters of urine of pregnant women; the upper reference values were formed. The women (n=158) with uncomplicated course of pregnancy were examined. No calculation of reference intervals was applied to leukocytes, erythrocytes, pavement and transitional/renal epithelium, cylinders (pathological ones included) due to their correspondence to similar values for non-pregnant women. for indices of bacteria and crystals proper upper reference thresholds were calculated that in trimesters I, II and III amounted to 452,8, 687,9 u 571,4 u/mkl for bacteria, and 0,59, 0,92 u 0,7 u/mkl for salts correspondingly.

Key words: urine analysis; reference intervals; pregnancy; Sysmex UF.

Для корреспонденции: Кесслер Юлия Валерьевна, врач клин. лаб. диагностики; e-mail: y_kessler@oparina4.ru

For citation: Kessler Yu.V., Ivanets T.Iu., Kolod'ko V.G. The reference intervals of main parameters of urine for analyzers SYSMEX UF 1000I/500I in dynamics of uncomplicated pregnancy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (8): 472-475. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-472-475>*

For correspondence: Kessler Yu.V., physician of clinical laboratory diagnostic. e-mail: y_kessler@oparina4.ru

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

Acknowledgment. The authors express their gratitude to M. Pimenov for support in statistical data processing.

Received 10.04. 2017
 Accepted 25.04. 2017

Анализ мочи — одно из наиболее часто назначаемых скрининговых лабораторных исследований, поскольку позволяет получить информацию о состоянии органов мочеобразования и мочевыведения. Внедрение автоматизированных анализаторов форменных элементов мочи позволило не только ускорить выполнение анализа, но и стандартизировать исследование, исключив субъективные факторы, влияющие на результат. Новые технологии, различные принципы измерения, лежащие в основе работы анализаторов форменных элементов мочи, диктуют необходимость выработки референсных значений. Согласно рекомендациям Международной федерации клинической химии (IFSS) и Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI), каждая лаборатория должна определить собственные референсные интервалы исследуемых параметров, используя конкретные методы и лабораторное оборудование [1]. На сегодняшний день разработаны референсные интервалы форменных элементов мочи для здоровой популяции населения в зависимости от пола и возраста, полученные методом проточной цитофлуориметрии с помощью анализаторов Sysmex UF-1000i/500i [2—6], но нет данных обследования беременных женщин.

Во время беременности происходят физиологические изменения как в мочевом тракте, так и в функционировании почек, что связано с давлением растущего плода и увеличивающейся матки на почки и мочевыводящие пути, и с увеличением объёма выведения продуктов обмена организма матери и плода. В результате возможен застой мочи и, как следствие, повышается риск восходящей инфекции мочевых путей. Актуальна при беременности проблема асимптомной бактериурии, которая может привести к серьёзным осложнениям у матери и плода [7, 8]. Согласно нормативным актам, клинический анализ мочи входит в перечень обязательных обследований во время беременности [9].

Цель данной работы — определение референсных значений для диагностических и инструментальных параметров мочи, полученных методом проточной цитофлуориметрии с помощью анализаторов Sysmex UF-1000i/500i у здоровых беременных женщин.

Материал и методы. В исследование были включены женщины ($n = 158$) в возрасте 22—45 лет с неосложнённой одноплодной и многоплодной (двойня) беременностью, наблюдавшиеся в поликлиническом отделении НЦАГиП им. В.И. Кулакова. Пациентки были распределены на 3 группы в зависимости от срока гестации: I триместр (до 14 недель гестации включительно), II триместр (15—26 недель гестации включительно), III триместр (27—41 неделя гестации) (табл. 1). Каждая пациентка сдавала анализ мочи от 1 до 3 раз в течение беременности. Критериями исключения были сопутствующие заболевания (сахарный диабет, онкологические заболевания, ИБС, артериальная гипертензия любой этиологии, преэклампсия и т. д.) у пациенток в анамнезе и при данной беременности, а также наличие заболеваний мочевой системы в анамнезе и при данной беременности. Антропометрические данные беременных представлены в табл. 2. Все женщины были некурящими. В контрольную группу вошли небеременные ($n = 121$) в возрасте 19—44 лет.

Согласно рекомендациям, для анализа собирали утреннюю среднюю порцию мочи в одноразовые пластиковые

контейнеры Нем (Россия). Особое внимание уделяли правильному сбору мочи (тщательный туалет наружных половых органов, сбор мочи в утренней средней порции), так как нарушения на этом этапе могут привести к искажению клинической картины [10—12].

В исследование были включены образцы без патологии, по результатам сухой химии (полуавтоматический анализатор мочи Aution Eleven AE-4020 ARKRAY, Япония). Образец исследовали в течение 2 ч после поступления в КДЛ методом проточной цитофлуориметрии на анализаторах Sysmex UF-1000i/500i (Sysmex Corporation, Япония). Референсные интервалы определяли для 8 параметров: эритроцитов, лейкоцитов, цилиндров (в том числе патологических), плоского и переходного/почечного эпителия, бактерий и кристаллов. Согласно данным фирмы-производителя, 5 из них диагностические (для них фирма-производитель предоставляет значения в контрольных материалах): лейкоциты, эритроциты, цилиндры, плоский эпителий, бактерии; 3 других параметра — инструментальные (для них фирма-производитель не предоставляет значения в контрольных материалах): патологические цилиндры, переходный/почечный эпителий и кристаллы.

Для расчёта референсных интервалов использовали статистический анализ с применением коэффициента Skewness и коэффициента Kurtosis, нормальность определяли тестом D'Agostino—Pearson при $p = 0,05\%$ уровне значимости, используя MedCalc версии 16.8.4 (MedCalc Software, Бельгия). Для определения выпадающих значений — тест Turkey (1977). Верхнюю границу РИ каждого показателя определяли на уровне 97,5 процентиля.

Согласно рекомендациям NCCLS и CLSI, если размер выборки превышал 120 значений, применяли непараметрический метод оценки; если выборка в группе включала менее 120 значений, использовали метод Robust.

При непараметрическом методе здоровые доноры считаются представителями материнской популяции, поэтому для достоверных результатов требуется большая выборка. Однако для получения референсных значений, которые имеют только один порог (верхний или нижний), например компонентов мочи, где базовый уровень 0, этот размер выборки приемлем [6].

Результаты. Для лабораторных параметров мочи актуален только верхний порог референсных значений, который и был рассчитан нами на основании анализа данных 3 групп здоровых беременных женщин (в зависимости от гестационного срока).

Результаты сравнивали с референсными значениями, предложенными фирмой-производителем (табл. 3).

Таблица 1

Распределение обследованных женщин по группам

Группа	n
Небеременные женщины (контроль)	121
Беременные:	
I триместр	26
II триместр	111
III триместр	132

Таблица 2

Распределение обследованных женщин с неосложнённой беременностью по группам (среднее ± SD)

Группа	n	Антропометрические данные (до беременности)			Одноплодная беременность, %	Образцы мочи, n
		возраст, лет	вес, кг	рост, см		
I триместр	25	33,1 ± 4,6	60,75 ± 9,7	167,9 ± 5,1	92,3	26
II триместр	55	33,5 ± 4	60,74 ± 10,3	165,6 ± 4,4	87,4	111
III триместр	78	32,2 ± 3,42	61,45 ± 10,8	166,3 ± 5,3	94,7	132

Таблица 3

Верхние границы референсных значений диагностических параметров мочи для женщин (анализаторы Sysmex UF-1000i/500i, S. Terajima, 2009)

Возраст, годы	Параметр, ед./мкл				
	эритроциты	лейкоциты	эпителий плоский	цилиндры	бактерии
Общая группа (все возрастные категории)	30,7	39	45,6	2,4	385,8
До 39 включительно	35,4	42,0	51,0	3,14	452,8
40—49	25,8	43,9	52,3	2,5	454,1
50—59	30,9	27,0	39,2	2,13	313,2
Старше 60	34,0	36,2	24	2,05	139,8

Таблица 4

Референсные диапазоны диагностических параметров мочи для небеременных женщин и женщин с неосложнённым течением беременности

Параметр	Контрольная группа	I триместр	II триместр	III триместр
Лейкоциты (WBC), кл./мкл				
Верхний предел	15,43*	8,01*	33,5*	23,39*
Доверительный интервал 90% (CI)	10,8—20,2	6,04—9,6	23,27—42,76	16,80—43
Эритроциты (RBC), кл./мкл				
Верхний предел	27,02*	31,51**	33,52**	11,1*
Доверительный интервал 90% (CI)	22,9—33,1	12,68—48,59	16,04—46,3	9,5—16,3
Плоский эпителий (EC), кл./мкл				
Верхний предел	29,65*	20,21*	43,83*	30*
Доверительный интервал 90% (CI)	14,4—45,2	4,86—30,98	25,46—58,49	17,8—39
Цилиндры (CAST), ед./мкл				
Верхний предел	1,38*	3,89**	0,88*	1,26*
Доверительный интервал 90% (CI)	1,01—2,78	—	0,76—1,03	1,04—1,96
Бактерии (BACT), кл./мкл				
Верхний предел	435,37*	190,72*	687,92**	571,4**
Доверительный интервал 90% (CI)	309,5—565,3	120,66—240,53	514,41—846,08	360,4—898,7

Примечание. * — при $p < 0,05$ при сравнении с общей группой; ** — при $p < 0,05$ при сравнении с группой женщин до 39 лет (см. табл. 3); «—» — доверительный интервал не рассчитан из-за малой выборки.

Референсные диапазоны диагностических параметров мочи в группе здоровых небеременных женщин активного репродуктивного возраста и 3 групп женщин с неосложнённой беременностью суммированы в табл. 4.

Верхние пределы референсных интервалов количества эритроцитов, лейкоцитов, цилиндров, плоского эпителия и бактерий у небеременных здоровых женщин в целом согласовались с данными других авторов для референсной популяции, на которые ссылается фирма-производитель [6].

Верхние пороговые значения уровня лейкоцитов, цилиндров и плоского эпителия в анализе мочи беременных женщин независимо от срока гестации были сопоставимы с полученными в контрольной группе и не превышали соответствующих референсных диапазонов, предложенных фирмой-производителем для общей группы небеременных здоровых женщин. В то же время верхние пороговые значения эритроцитов в 2 группах беременных оказались выше референсных диапазонов, предложенных для общей группы небеременных женщин, но не превышали соответствующего параметра для группы здоровых небеременных женщин до 39 лет включительно [6].

Поскольку беременные женщины до 39 лет включительно составили 92% общего числа беременных, участвовавших в исследовании, рекомендуем использовать референсные диапазоны именно этой возрастной категории для оценки диагностических параметров мочи беременных при неосложнённой беременности независимо от срока гестации (см. табл. 3).

Верхний порог референсных значений количества бактерий у беременных женщин во II и III триместрах оказался достоверно выше, чем в I триместре и в контрольной группе, и превышал значение, предложенное Shigeru Terajima [6].

Также были рассчитаны верхние референсные пределы исследовательских параметров мочи, которые могут иметь клиническую значимость как при обследовании здоровых небеременных женщин, так и при интерпретации результатов анализа мочи у беременных.

Полученные данные сравнивались с данными фирмы-производителя (табл. 5).

Собственные данные представлены в табл. 6.

Полученные верхние пределы референсных интервалов количества эпителия переходного/почечного, патологических цилиндров и кристаллов в контрольной группе в целом были соразмерны с данными Shigeru Terajima [6] (см. табл. 5).

Верхние пороговые значения количества эпителия переходного/почечного и патологических цилиндров в анализе мочи беременных женщин независимо от срока гестации

вписывались в соответствующие референсные диапазоны для общей группы небеременных здоровых женщин, а верхний порог кристаллов превышал значение, предложенное Shigeru Terajima и полученное в контрольной группе (см. табл. 5, 6).

Обсуждение. Использование автоматизированного анализа мочи при скрининговом обследовании имеет объективные

Таблица 5

Верхние границы референсных значений исследовательских параметров мочи женщин (анализаторы Sysmex UF-1000i/500i) (S. Terajima, 2009)

Параметр, ед./мкл		
эпителий переходный/ почечный	цилиндры патологические	кристаллы (соли)
5,97	0,667	0,304

Таблица 6

Верхние границы референсных значений исследовательских параметров мочи для беременных женщин и женщин с неосложнённым течением беременности, ед./мкл

Параметр, верхний предел (CI 90%)	Контрольная группа	I триместр	II триместр	III триместр
Клетки переходного/почечного эпителия (SRC)	2,7	2,39	3,9	4,56
Цилиндры патологические (Path. CAST)	0,25	0,39	0,26	0,39
Кристаллы (соли) (X ^{TAL})	0,33	0,59	0,92	0,7

преимущества по сравнению с классической микроскопией. Количественное значение клинически важных параметров мочи позволяет не только стандартизировать само исследование, но и выявить патологический процесс на ранней стадии развития. Немаловажно и уменьшение времени обработки и измерения образца, что увеличивает пропускную способность лаборатории и, как следствие, уменьшает себестоимость анализа. Но для клинициста актуальна не только скорость выполнения анализа, но и адекватная интерпретация результата. Это особенно принципиально, когда речь идёт о беременных, о комплексной оценке состояния организма не только матери, но и будущего ребенка. Поэтому выработка референсных интервалов для параметров скрининговых исследований, к которым относится и моча, для беременных женщин имеет не меньшее значение, чем для других групп здорового населения.

Заключение. В данной работе исследования проводились на анализаторе Sysmex UF-1000i/500i (Япония), в основе работы которого лежит метод проточной цитофлуориметрии. Были сформированы референсные диапазоны для 8 параметров мочи в зависимости от срока неосложненной беременности, согласно правилам, регламентированным руководствами CLSI и IFCC.

При анализе полученных данных показано, что референсные диапазоны диагностических параметров мочи: количество лейкоцитов, эритроцитов, плоского эпителия, цилиндров, используемые в группе здоровых небеременных женщин до 39 лет включительно, подходят для интерпретации результатов соответствующих элементов мочи у беременных. При оценке рассчитанных верхних референсных порогов исследовательских параметров мочи: переходного/почечного эпителия и патологических цилиндров в анализе мочи беременных женщин независимо от срока гестации могут использоваться значения, предложенные Shigeru Terajima для небеременных женщин.

Наши данные подтверждают, что верхний порог количества бактерий в моче у женщин во II и III триместрах неосложненной беременности и количества солей у беременных в динамике всего периода гестации выше соответствующих значений контрольной группы и фирмы-производителя (Sysmex, Япония).

В качестве верхней границы референсного диапазона параметра бактерий предлагаем использовать для I триместра

значение Shigeru Terajima для группы небеременных женщин до 39 лет (452,8 ед./мкл), а для II и III триместров — 687,9 и 571,4 ед./мкл соответственно.

В качестве верхнего референсного порога параметра солей рекомендуем использовать полученные нами значения для I, II и III триместров беременности — 0,59, 0,92 и 0,7 ед./мкл соответственно (см. табл. 6).

Повышенное количество бактерий и солей в моче беременных может быть обусловлено физиологическими и анатомическими особенностями самого гестационного процесса, а также особенностью питания во время беременности.

Полученные значения можно использовать в других клинико-диагностических лабораториях после соответствующей валидации согласно требованиям CLSI [1].

Благодарности. Авторы выражают благодарность М. Пинену за помощь в статистической обработке данных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3—6, 11, 12) см. REFERENCES

- Станкевич Л.И., Мельничук О.С., Семикина Е.Л., Маянский Н.А., Гонтард П.Ч.Г. Референсные интервалы форменных элементов мочи, полученные методом проточной цитофлуориметрии с помощью анализаторов Sysmex UF-1000i/UX-2000, *Современная лабораторная диагностика*. 2016; 1(18): 15—8.
- Хиггинс К. *Расшифровка клинических лабораторных анализов*. М.: Бинном; 2008; 331—2.
- Беркоу Р. *Руководство по медицине*. М.: Мир; 1997; II: 88.
- Приказ Минздрава РФ от 2012 г. № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология»».
- Долгов В.В., Меньшиков В.В., ред. *Национальное руководство к клинической лабораторной диагностике*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012; I: 313.

REFERENCES

- Horowitz G.L., Altaie S., Boyd J.C., Ceriotti F., Gard U., Horn P. et al. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: C28-A3 approved guideline*. Third Edition CLSI document, 2010.
- Stankevich L.I., Melnychuk O.S., Semikina E.L., Majansky N.A., P.H. G. Gontard, Reference intervals of urine formed elements obtained by flow-cytometry using analyzers Sysmex UF-1000i/UX-2000. *Sovremennaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 1(18): 15—8. (in Russian)
- Manoni Fabio, Gessoni Gianluca et al. Gender's equality in evaluation of urine particles: Results of a multicenter study of the Italian Urinalysis Group. *Clin. Chim. Acta*. 2014; 427: 1—5.
- Manoni Fabio, Gessoni Gianluca et al. Pediatric reference values for urine particle quantification by using automated flow cytometer: results of a multicenter study of Italian urinalysis group. *Clin. Biochemistry*. 2013; 46: 1820—4.
- Mayumi Terachi, Nishida Youko, Funahashi Junko, Kakizoe Keiko, Toichi Mika, Shimada Miharuru et al. Evaluation study for reference interval of UF-1000i using urine specimens from school children. *Sysmex J. Int.* 2010; 19: 47—50.
- Terajima Shigeru, Yokomizo Hajime, Yagi Atsuko, Miura Mashashi, Amano Chinatsu. Evaluation study for reference intervals of urine sediments using UF-1000i in medical check-up population. *Sysmex J. Int.* 2009; 19: 82—6.
- Higgins R. Transcript of clinical laboratory tests [Rasshifrovka klinicheskikh laboratornykh analizov]. Moscow: Binom; 2008: 331—2. (in Russian)
- Berkou R., Ed. *Manual medicine [Rukovodstvo po meditsine]*. Moscow: Mir; 1997; II: 88. (in Russian)
- The order of Ministry of Health of the Russian Federation from 2012 № 572n «On approval of the Procedure of rendering of medical aid according to the specialty «obstetrics and gynecology»». (in Russian)
- Dolgov V.V., Men'shikov V.V., eds. *National Manual of clinical laboratory diagnostics [Natsional'noe rukovodstvo klinicheskoy laboratornoy diagnostiki]*. Moscow: GEOTAR-Media. 2012; I: 313. (in Russian)
- Dufour D. Robert. *Clinical use of laboratory data*. 1998: 354.
- Coppens A., Speeckaert M., Delenghe J. The pre-analytical challenges of routine urinalysis. *Acta Clin. Belg.* 2010; 65: 182—8.

Поступила 10.04.17
Принята к печати 25.04.17

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-008.939.17-078.33

Телесманич Н.Р., Коновальчик М.А., Микашинович З.И.

АНАЛИЗ УРОВНЯ ОБЩЕГО ИММУНОГЛОБУЛИНА E (IGE) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЛЮДЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ НАРУШЕНИЙ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА И ГРУППАМИ КРОВИ O (I), A (II), B (III)

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра общей и клинической биохимии № 1, 344022, Ростов-на-Дону, Россия

Исследованы показатели IgE-опосредованной иммунологической реакции (общий IgE) у людей с нарушениями углеводного обмена и при диабете, имеющих разные группы крови (AB0) (n = 93). Коэффициент парной корреляции выявил прямую взаимосвязь между O (I) группой крови и риском развития диабета 2-го типа (r = 0,8) и высоким риском возникновения сахарного диабета 1-го типа у людей с A (II) группой крови (r = 1). Средние значения показателей общего IgE у людей с O (I) и A (II) группами крови были соотносимы и существенно отличались от уровня общего IgE B (III) группы крови. При выраженном нарушении углеводного обмена представители O (I) и A (II) групп крови имели показатели общего IgE $43,61 \pm 15,12$ и $86,2 \pm 42,61$ кМЕ/л соответственно, что в среднем в 4 раза ниже, чем показатели представителей B (III) группы крови, у которых общий IgE при диабете 2-го типа увеличивался в 2 раза относительно верхней границы нормы и составлял $209,65 \pm 52,5$ кМЕ/л.

Ключевые слова: иммуноглобулин E, IgE; общий IgE; нарушения углеводного обмена; сахарный диабет; группы крови (AB0).

Для цитирования: Телесманич Н.Р., Коновальчик М.А., Микашинович З.И. Анализ уровня общего иммуноглобулина E (IgE) в сыворотке крови людей с различными типами нарушений углеводного обмена и группами крови O(I), A (II), B (III). Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (8): 476-481. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-476-481>

Telesmanich N.R., Konoval'chik M.A., Mikashinovich Z.I.

THE ANALYSIS OF LEVEL OF TOTAL IMMUNOGLOBULIN E (IGE) IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH VARIOUS TYPES OF DISORDERS OF CARBOHYDRATE METABOLISM AND BLOOD GROUPS O (I), A (II) AND B (III)

The Rostovskii state medical university of Minzdrav of Russia, 344022 Rostov-on-Don, Russia

The analysis was applied to indices of IgE-mediated immunological reaction (total IgE) in patients with disorders of carbohydrate metabolism and diabetes and different blood groups (AB0) (n=93). The coefficient of pair correlation established a direct relationship between blood group O (I) and risk of development of diabetes type II (r=0.8) and higher risk of development of diabetes type I in patients with blood group A (II) (r=1). The average values of indices of total IgE in patients with blood groups O (I) and A (II) were compared and significantly differed the level of total IgE of blood group B (III). In case of expressed disorder of carbohydrate metabolism patients with blood groups O (I) and A (II) had indices of total IgE $43,61 \pm 15,12$ и $86,2 \pm 42,61$ kIU/l correspondingly that in average is four times lower than indices of patients with blood group B (III) who in case of diabetes type II had total IgE increased twice relatively to upper limit of standard amounting to $209,65 \pm 52,5$ kIU/l.

Key words: immunoglobulin E, IgE; total IgE; disorders of carbohydrate metabolism; diabetes mellitus; blood groups (AB0)

For citation: Telesmanich N.R., Konoval'chik M.A., Mikashinovich Z.I. The analysis of level of total immunoglobulin E (IgE) in blood serum of patients with various types of disorders of carbohydrate metabolism and blood groups O (I), A (II) and B (III). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (8): 476-481. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-476-481>

For correspondence: Konoval'chik M.A., post-graduate student of the chair of general and clinical biochemistry. e-mail: mariya_konovalchik@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 07.03. 2017
Accepted 20.03.2017

Введение. Известно, что IgE отличаются от иммуноглобулинов других классов уникальной способностью фиксироваться на наружной мембране клеток, благодаря

строению Fc-фрагмента IgE, состоящего из 3 высокоаффинных доменов, которых нет у других классов иммуноглобулинов [1]. Установлено, что рецептором для IgE

Для корреспонденции: Коновальчик Мария Алексеевна, аспирант каф. общей и клинической биохимии; e-mail: mariya_konovalchik@mail.ru

(IgE-связывающими факторами) служит экспрессируемый на базофилах и клетках Лангерганса FcεR1 высокоаффинный рецептор, а также низкоаффинный рецептор FcεR2 или CD 23, представленный на Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и дендритных клетках [2]. Показано, что гены сывороточного IgE картируются на одной хромосоме с другими реагинами (5q и 12q) и интерлейкинами (CD 14), х-рецепторами, что способствует формированию фенотипа иммунной реактивности [3].

В последние годы показана роль провоспалительных цитокинов в патогенезе инсулинозависимого диабета и их участие в развитии инсулинорезистентности при инсулиннезависимом диабете у пациентов с ожирением [4]. Установлено, что развитие микроангиопатий при инсулинозависимом диабете (ИЗСД) и инсулиннезависимом (ИНСД) связано с хроническим воспалительным процессом и с образованием иммунных комплексов [5, 6]. Показано [6], что непосредственное участие в этом принимают активированные моноциты-макрофаги, иммуноглобулины, цитокины, адгезивные молекулы, продукты конечного гликозилирования [7]. Существует мнение, что у людей с разными группами крови системы АВ0 могут быть различия в индивидуальном уровне адаптивной реакции организма. Например, показано, что люди с группой крови 0 (I) намного устойчивее к стрессу, чем с А (II), если последние попадают в травмирующую ситуацию, то выход из нее и восстановление организма обычно занимает больше времени, чем у обладателей других групп крови [8, 9]. Подмечено, что для обладателей группы крови А (II) характерно наибольшее содержание инсулина и кортизола в сыворотке крови [10]. Поэтому анализ группоспецифических, метаболических особенностей, связанных с IgE-опосредованными механизмами, может иметь прогностическое значение при различных формах нарушения углеводного обмена.

Цель работы — анализ концентрации общего IgE в сыворотке крови у пациентов с различными показателями уровня глюкозы, в зависимости от антигенов групп крови 0 (I), А (II), В (III).

Материал и методы. Исследования проводили с ноября 2015 г. по октябрь 2016 г. ($n = 102$, возраст от 19 лет до 90 лет).

У всех обследованных определяли группу крови (AB0), уровень глюкозы, гликозилированного гемоглобина, общего (сывороточного) IgE.

Из 102 обследованных только у 9 человек определена АВ (IV) группа крови, поэтому для анализа были взяты 0 (I), А (II), В (III) группы крови, которые представляли достаточную статистическую выборку: 0 (I) группа — 32 человека, А (II) — 27 человек, В (III) — 34, всего 93 человека. Из них с нарушениями углеводного обмена — 82 пациента, которые были разделены на 4 подгруппы.

Подгруппа 0 — контрольная группа; подгруппа 1 — с показателями глюкозы и гликозилированного гемоглобина (HbA1c) по нижней границе нормы и ниже нормы (глюкоза 2,2—4,1 ммоль/л; HbA1c 3,7—5%); подгруппа 2 — показатели глюкозы и гликозилированного Hb по верхней границе нормы и тенденции к превышению нормы (глюкоза 6,2—7,8 ммоль/л; HbA1c 5,9—6,9%); подгруппа 3 — выраженное нарушение толерантности к глюкозе (глюкоза 8—20,3 ммоль/л; HbA1c 6,7—13,6%).

Для определения групп крови человека системы АВ0 использовали моноклональные антитела класса IgM мышинных гибридом анти-А, анти-В, анти-AB в реакции

прямой геммагглютинации на плоскости «Эритрогест—цоликлоны» (ООО «Гематолог», Москва).

Общий IgE в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа «ДС-ИФА—IgE общий» (НПО «Диагностические системы» Нижний Новгород). Тест-система представляет собой «сэндвич-вариант» одностадийного твердофазного ИФА. Для его реализации использовали два моноклональных антитела с разной специфичностью к двум доменам молекулы IgE: иммобилизованным на твердой фазе и входящие в состав конъюгата (в соответствии с инструкцией по применению НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород). В качестве контроля использовали коммерческую сыворотку с известным содержанием IgE. Диагностическая интерпретация для взрослых — показатели нормы от 25 до 100 кМЕ/л.

Концентрацию глюкозы в сыворотке крови определяли энзиматическим колориметрическим методом, использовали набор реагентов (производитель ООО «Ольвекс Диагностикум», Санкт-Петербург). Принцип метода: β-D-глюкоза под действием фермента глюкозооксидазы окисляется до D-глюконолактона. Образующаяся H₂O₂ под действием пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения — хинониминового красителя. Расчет концентрации глюкозы в крови (С, ммоль/л) проводят по формуле:

$$C_{\text{гл}} = \frac{E_{\text{пробы}}}{E_{\text{калибр}}} \cdot 10 \text{ ммоль/л,}$$

где: $E_{\text{пробы}}$ — оптическая плотность исследуемой пробы; $E_{\text{калибр}}$ — оптическая плотность калибровочной пробы; 10 ммоль/л — концентрация глюкозы в калибраторе. Диагностическая интерпретация для взрослых — показатели нормы от 4,2 до 6,1 ммоль/л.

Процентное содержание гликогемоглобина (HbA1c) в крови определяли с помощью набора «Гликогемотест» (Москва), который применяют для диагностики латентной (скрытой) формы сахарного диабета. Принцип метода основан на аффинной хроматографии в микроколонке гликозированной и негликозированной фракции гемоглобина гемолизата крови. Нормальные величины HbA1c у здоровых людей составляет 4—6,2% (NGSP). Содержание гликогемоглобина HbA1c рассчитывали по формуле:

$$\%HbA1c = \frac{ОП(Б) \cdot 100}{ОП(Б) + 2,07 \cdot ОП(А)} \cdot 0,71 + 1,9$$

где: ОП (Б) — оптическая плотность фракции Б; ОП (А) — оптическая плотность фракции А; 2,07 — пересчетный коэффициент оптической плотности фракции А (соотношение объема фракции А, равной 6,2 мл и фракции Б, равной 3 мл); 100 — пересчетный коэффициент для вычисления процентного содержания; 0,71 + 1,9 — пересчетные коэффициенты для вычисления фракции HbA1c из общего содержания гликогемоглобина.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программного пакета Statistica версии 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, США). Коэффициент парной корреляции (r) рассчитывали в программе Exceltpr — степень взаимосвязи — в диапазоне 0—1 (сильная отрицательная связь) до +1 (сильная положительная связь). При $r = 0$ между переменными x и y — у показателей нет связи.

Результаты. В исследовании участвовали 93 человека с 0 (I), А (II), В (III) группами крови.

Таблица 1

Корреляция парной зависимости между показателями углеводного обмена и группами крови 0 (I), A (II), B (III)

Группа крови	n	Уровень глюкозы и гликозилированного Hb выше нормы, % (>6,88 ± 0,15 ммоль/л; >6,43 ± 0,08%)	r *	СД 2,% (глюкоза > 11,49 ± 1,28 ммоль/л; гликозилированный Hb > 8,8 ± 0,7%)	r *	СД 1,% (глюкоза > 12,1 ± 2,4 ммоль/л; гликозилированный Hb > 9,2 ± 1,3%)	r *
0 (I)	32	63	0,83	47	0,8	9	0,6
A (II)	27	59	0,8	41	0,7	7	1
B (III)	34	53	0,8	29	0,67	0	—

*r = 0,9—1 — сильная прямая взаимосвязь; *r = -0,9 до -1 — сильная обратная взаимосвязь; *r = 0 нет связи; *r = посередине от 0 до 1 или от 0 до -1 — слабая связь (прямая или обратная).

0 (I) группа крови оказалась у 32 человек. Нарушение углеводного обмена наблюдалось у 21 человека — глюкоза выше нормы. Подгруппа 2 (глюкоза 6,2—7,6 ммоль/л), n = 11 и подгруппа 3 (глюкоза 8,0—20,3 ммоль/л), n = 10 — 63%. Подгруппа 1 (3,0—4,1 ммоль/л — глюкоза ниже нормы), n = 4 (12,5%). С диагнозом «сахарный диабет 2-го типа» (СД2) — 12 (47%) человек в возрасте от 48 до 79 лет; «сахарный диабет 1-го типа» (СД1) — 3 (9%) человека в возрасте 19—34 лет (табл. 1).

A (II) группа крови определена у 27 человек. Нарушение углеводного обмена обнаружено у 16 человек — глюкоза выше нормы. Подгруппа 2 (глюкоза 6,2—7,8 ммоль/л), n = 9 и подгруппа 3 (глюкоза 8,2—16,0 ммоль/л), n = 7 — 59%. Подгруппа 1 (2,9—4,0 ммоль/л — глюкоза ниже нормы), n = 5 (18,5%). СД2 — 11 (41%) человек в возрасте 45—78 лет; СД1 — 2 (7%) человека в возрасте 26—27 лет (см. табл. 1).

B (III) группа крови определена у 34 человек, из них 19 с нарушениями углеводного обмена — глюкоза выше нормы. Подгруппа 2 (глюкоза 6,2—6,9 ммоль/л), n = 9 и подгруппа 3 (глюкоза 7,4—17,5 ммоль/л), n = 10 — 53%. Подгруппа 1 (2,2—3,2 ммоль/л — глюкоза ниже нормы), n = 2 (5,8%). СД2 — 10 (29%) человек в возрасте 24—74 лет; СД1 — 0% (см. табл. 1).

Результаты корреляционного анализа показали наличие сильной прямой взаимосвязи между 0 (I) группой крови и риском развития СД2 (r = 0,8) и A (II) группой крови и риском заболевания СД1 (r = 1). Антигены B (III) группы крови имели наименьший коэффициент корреляции с риском возникновения СД1 и СД2.

Соотношение показателей гликозилированного гемоглобина и общего IgE совпадало с соотношением показателей глюкозы и общего IgE у всех групп крови.

Средние значения общего IgE у 0 (I) и A (II) групп крови были соотносимы и существенно отличались от общего IgE у B(III) группы (табл. 2—4). Так, максимальный всплеск общего IgE у 0 (I) и A (II) групп крови наблюдался в подгруппе 2 (глюкоза 6,2—7,6 ммоль/л, среднее значение 6,88 ± 0,15) (см. табл. 2, 3). Общий IgE составлял 261,88 ± 86,8 кМЕ/л для 0 (I) группы крови, а для A (II) — 209,19 ± 103,57 кМЕ/л. Несмотря на то что 0 (I) и A (II) группы крови «вели себя» очень похоже, реактогенность 0 (I) группы крови в индукции общего IgE была сильнее по среднему показателю, чем A (II). Соответственно 261,88 ± 86,8 для 0 (I) и 209,19 ± 103,57 кМЕ/л для A (II). У B (III) группы крови при глюкозе в диапазоне 6,2—6,9 ммоль/л подгруппа 2 (среднее значение 6,5 ± 0,09 ммоль/л) общий IgE был равен 131,4 ± 46,6 кМЕ/л.

У подгруппы 3 с нарушением толерантности к глюкозе у 0 (I) группы крови (среднее значение 11,49 ± 1,28 ммоль/л) и A (II) (11,21 ± 0,96 ммоль/л), показатели общего IgE резко падали: у 0 (I) до 43,61 ± 15,12 кМЕ/л (см. табл. 2), а у A (II) до 86,2 ± 42,61 кМЕ/л (табл. 3), в отличие от B (III) группы крови, где IgE общий в подгруппе 3 составлял 209,65 ± 52,5 кМЕ/л (см. табл. 4), что в 2,4 и 4,8 раза выше, чем у 0 (I) и A (II) групп крови соответственно.

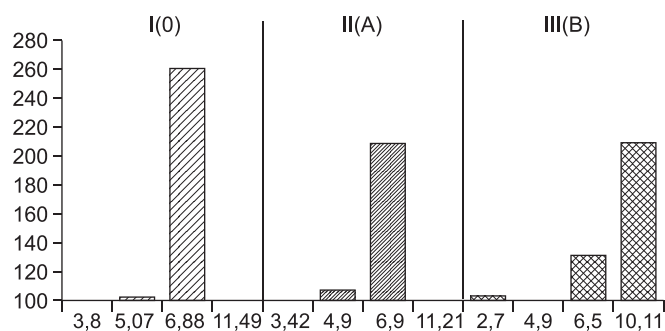
Закономерность, выявленная в B (III) группе крови (подгруппе 2) существенно отличалась от первых двух. При диапазоне уровня глюкозы 6,2—6,9 ммоль/л, при среднем значении 6,5 ± 0,09 ммоль/л, среднем глико-

зилированном гемоглобине 6,2 ± 0,07% общий IgE был значительно ниже — 131,4 ± 46,6 кМЕ/л, чем у первых двух групп крови (см. табл. 4): по сравнению с 0 (I) — в 2 раза, с A(II) — в 1,5. Однако при выраженном повышении уровня глюкозы до 10,11 ± 0,92 ммоль/л, (подгруппа 3) общий IgE превышал верхнюю границу нормы в 2 раза (209,65 ± 52,2 кМЕ/л). Тенденция к повышению общего IgE начиналась у B (III) группы крови уже с низких значений глюкозы (2,7 ± 0,5 ммоль/л) и составляла нижнюю границу нормы общего IgE 103,2 ± 64,1 кМЕ/л (см. рисунок). Таким образом, у B (III) группы крови повышение уровня глюкозы соотносилось с повышением IgE (глюкоза 2,7 ± 0,5 ммоль/л — общий IgE 103,2 ± 64,1 кМЕ/л; глюкоза 6,5 ± 0,09 ммоль/л — общий IgE 131,4 ± 46,6 кМЕ/л; глюкоза 10,11 ± 0,92 ммоль/л — общий IgE 209,65 ± 52,2 кМЕ/л соответственно).

Вместе с тем у 0 (I) и A (II) группы крови — при «низкой» глюкозе (подгруппа 1), общий IgE падал в 3 раза ниже верхней границы нормы (25—100 кМЕ/л), как и при СД2 (подгруппа 3). При глюкозе, равной 11,49 ± 1,28 ммоль/л (подгруппа 3) у людей с 0 (I) группой крови, уровень IgE падал в 2 раза ниже верхней границы нормы (43,61 ± 15,12 кМЕ/л), что ниже в 4 раза, чем у людей с B (III) группой крови в подгруппе 3, а у группы крови A (II) в этой же подгруппе содержание IgE составляло 86,2 ± 42,61 кМЕ/л, что ниже в 2 раза, чем у страдающих диабетом B (III) группы крови.

Обсуждение. Олигосахаридные компоненты гликопротеинов мембран клеток выполняют роль информационных структур или антигенных детерминант, обеспечивающих передачу сигнала в клетку при помощи рецепторов-лектинов. Так, групповая специфичность крови определяется составом антигенных детерминант, сосредоточенных на внешней поверхности мембран эритроцитов, что свидетельствует о важной информационной роли углеводов в обеспечении иммунитета организма [9, 11].

Известно, что 0 (I) группа крови имеет на своей поверхности простейший набор углеводов, представленных только фукозой, поэтому первооткрыватели ее назвали «нулевой» 0 (I), имея в виду отсутствие дополняющих антигенов [8, 9]. Группа крови A (II) представлена углеводными детерминантами фукозы и N-ацетилгалактозамина; B (III) — фукозы и D-галактозы; AB (IV) — фукозы N-ацетилгалактозамина и D-галактозы. Можно предположить, что фукоза и экранируемость её N-ацетилгалактозамином обуславливает формирование толерантных к глюкозе и инсулину состояний и не обеспечивает чувствительность клеток к инсулину. Неэкранируемая D-галактоза на поверхно-



Уровень зависимости средних показателей значений общего IgE и глюкозы у людей с нарушениями углеводного обмена для всех групп крови.

По оси абсцисс — глюкоза, ммоль/л; по оси ординат — общий иммуноглобулин E (IgE), кМЕ/л.

сти клеток В (III) может гидролизироваться 3 ферментами в организме человека: галактокиназой, галактозо-1-фосфатом уредилтрансферазой и УДФ-галактозо-4-эпимеразой, легко превращаясь в глюкозу [9].

Вопрос о роли реактинов, в частности общего IgE, в патогенезе разных форм нарушений углеводного обмена остается практически открытым. В настоящее время известно, что низкоаффинный рецептор IgE — CD23, или Fc-эпсилон-RII является гликопротеиновым, лектиновым рецептором типа C, содержит домен, характерный для Са-зависимых углеводсвязывающих белков, а также содержит 1 потенциальный сайт N-гликозилирования [12]. Анализ уже известного биохимического строения этого рецептора позволяет с высокой степенью вероятности предположить его метаболическое участие в углеводном обмене. Экспрессия рецепторов для IgE на клетках островков Лангерганса, в частности FCeRI; CD14; FCeRII (CD23), и участие этих рецепторов в созревании клеток островков Лангерганса [1, 12] свидетельствует, что они могут быть опосредованными маркерами нарушений углеводного обмена разной степени тяжести и отражают роль IgE в формировании полноценности клеток, отвечающих за продукцию инсулина. Последнее делает актуальными исследования в подтверждение данной гипотезы.

Судя по полученным результатам, нарушения углевод-

ного обмена и возникновение СД2 наиболее выражено у людей с 0 (I) группой крови ($r = 0,8$), в которой 47% имели СД2, а 9% — СД1 ($r = 0,6$). Второе место по степени нарушений углеводного обмена заняла группа А (II) — 41% СД2 ($r = 0,7$), 7% — СД1 ($r = 1$). Интересно, что для выявления антител к антигенам островков Лангерганса используют ткань поджелудочной железы именно 0 (I) донора [12, 13], что косвенно подтверждает результаты наших исследований о наибольшей подверженности СД людей с этой группой. Наименьший риск для возникновения осложнений, связанных с нарушениями углеводного обмена, продемонстрировала В (III) группа крови, СД2 в ней обнаружен у 29% ($r = 0,67$) и 0% СД1 (см. табл. 1). Подгруппа 2 В (III) группы крови, имеющая повышенные значения уровня глюкозы ($>6,1$ ммоль/л), характеризовалась более низким средним показателем уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина ($6,5 \pm 0,09$ ммоль/л и $6,2 \pm 0,07\%$ соответственно). Рост уровня общего IgE у людей с В (III) группой крови не носил характер «скачков» в ответ на изменение глюкозы, демонстрируя планомерное повышение уровня IgE. Очевидно, что комплекс реактинов в виде общего IgE играет адаптивную роль при возникновении нарушений углеводного обмена.

Известно, что уровень сывороточного IgE служит маркером генетически обусловленного типа иммунной реактивности, который отражает вероятный баланс Th1/Th2 [14]. Усиление поликлонального IgE ответа считают маркером экспансии Th2 [15]. Переключающими на синтез IgE цитокинами, влияющими на уровень общего IgE и на развитие Th2-клеток, являются Ил-4; Ил-13 [16]. Известно, что в регуляции синтеза IgE участвуют гормоны. Кортизол, инсулиноподобный фактор роста I, действует как сигнал для переключения В-лимфоцитов на синтез IgE [17, 18]. По данным зарубежных исследователей [19], существует связь между IgE-опосредованной аллергизацией и СД1. Ряд авторов утверждают, что СД1 характеризуется иммунологической реакцией, в которой доминируют Th1-клетки, в то время как IgE-опосредованная аллергия связана Th2-клетками. Известно, что Th1-эффекторы CD4⁺ играют существенную роль в противовирусном иммунитете. В соответствии с Th1/Th2-гипотезой иммунная система развивается либо через Th1-клетки, либо через Th2-клетки. Это будет означать, что развитие IgE-опосредованной аллергии будет понижать риск развития СД1 [20].

Единичными работами показано [21], что для обладателей группы крови А (II) характерно наибольшее со-

Таблица 2

Значения общего IgE и гликозилированного гемоглобина (HbA1c) у людей с 0 (I) группой крови с разным уровнем глюкозы в сыворотке крови ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Контрольная группа ($n = 7$), глюкоза (4,3—6 ммоль/л) HbA1c (4,9—5,7%)	Подгруппа 1 ($n = 4$), глюкоза (3—4,1 ммоль/л); HbA1c (4,2—5%)	Подгруппа 2 ($n = 11$), глюкоза (6,2—7,6 ммоль/л); HbA1c (5,9—6,8%)	Подгруппа 3 ($n = 10$), глюкоза (8,0—20,3 ммоль/л); HbA1c (6,8—13,6%)
Глюкоза [4,2—6,1 ммоль/л]	5,07 ± 0,2	3,8 ± 0,27 $p < 0,05$	6,88 ± 0,15 $p_1 < 0,05$	11,49 ± 1,28 $p_1 < 0,05$
HbA1c [4—6,2%]	5,29 ± 0,09	4,7 ± 0,18 $p < 0,05$	6,43 ± 0,08 $p_1 < 0,05$	8,8 ± 0,7 $p_1 < 0,05$
Общий IgE [25—100 кМЕ/л]	102,4 ± 45,98	38,78 ± 15,92 $p > 0,05$	261,88 ± 86,8 $p < 0,05$	43,61 ± 15,12 $p > 0,05$

Примечание. p — достоверно относительно контрольной группы; подгруппа 0 — контрольная группа; подгруппа 1 — нижняя граница нормы, ниже нормы; подгруппа 2 — верхняя граница нормы и тенденция к превышению нормы; подгруппа 3 — выраженное нарушение толерантности к глюкозе.

Таблица 3

Значения общего IgE и гликозилированного гемоглобина у людей с А(II) группой крови с разным уровнем глюкозы в сыворотке крови ($X \pm m$)

Показатель	Контрольная группа ($n = 6$), глюкоза (4,2—6 ммоль/л); HbA1c (4,8—5,7%)	Подгруппа 1 ($n = 5$), глюкоза (2,9—4 ммоль/л); HbA1c (4,2—4,8%)	Подгруппа 2 ($n = 9$), глюкоза (6,2—7,8 ммоль/л); HbA1c (5,9—6,9%)	Подгруппа 3 ($n = 7$), глюкоза (8,2—16 ммоль/л); HbA1c (7—11,3%)
Глюкоза [4,2—6,1 ммоль/л]	4,9 ± 0,28	3,42 ± 0,18 $p < 0,05$	6,9 ± 0,2 $p < 0,05$	11,21 ± 0,96 $p < 0,05$
HbA1c [4—6,2%]	5,2 ± 0,14	4,42 ± 0,11 $p > 0,05$	6,4 ± 0,13 $p < 0,05$	8,67 ± 0,52 $p < 0,05$
Общий IgE [25—100 кМЕ/л]	106,82 ± 64,48	42,68 ± 12,4 $p < 0,05$	209,19 ± 103,57 $p > 0,05$	86,2 ± 42,61 $p > 0,05$

Таблица 4

Значения общего IgE и гликозилированного гемоглобина (HbA1c) у людей с В (III) группой крови с разным уровнем глюкозы в сыворотке крови ($X \pm m$)

Показатель	Контрольная группа ($n = 13$), глюкоза (4,2—6,1 ммоль/л); HbA1c (4,8—5,9%)	Подгруппа 1 ($n = 2$), глюкоза (2,2—3,2 ммоль/л); HbA1c (3,7—4,3%)	Подгруппа 2 ($n = 9$), глюкоза (6,2—6,9 ммоль/л); HbA1c (5,9—6,5%)	Подгруппа 3 ($n = 10$), глюкоза (7,4—17,5 ммоль/л); HbA1c (6,7—12%)
Глюкоза [4,2—6,1 ммоль/л]	4,9 ± 0,2	2,7 ± 0,5 $p < 0,05$	6,5 ± 0,09 $p < 0,05$	10,11 ± 0,92 $p < 0,05$
HbA1c [4—6,2%]	5,2 ± 0,09	4,0 ± 0,30 $p < 0,05$	6,2 ± 0,07 $p < 0,05$	8,05 ± 0,49 $p < 0,05$
Общий IgE [25—100 кМЕ/л]	100,48 ± 22,97	103,2 ± 64,1 $p > 0,05$	131,4 ± 46,6 $p < 0,05$	209,65 ± 52,2 $p < 0,05$

держанию инсулина. Специфичность рецепторов клеток к инсулину, кроме тропности к липидам и фосфолипидам [22], по нашим данным, может объясняться группоспецифичностью антигенных детерминант групп крови.

Повышение уровня IgE антител связывают с тяжестью инфекционного процесса, в частности с тяжестью течения инфекционного мононуклеоза [23]. В эксперименте показано, что введение малых доз опухоеспецифических IgE-антител задержало рост опухолевого ксено-трансплантата, повышая противоопухолевый иммунитет [24]. Снижение концентрации IgE в крови отмечено при некоторых прогрессирующих опухолях и при определенных разновидностях агаммаглобулинемии. Было показано, что снижение продукции сывороточного IgE с одновременным повышением уровня IgG осуществляется через слушивание рецепторов CD14 (mCD14), который, по данным [12], является рецептором для ЛПС эндотоксинов бактерий (ОМ1М 15; 81; 20; 5q31). Его экспрессия влияет на функционирование клеток Лангерганса, дендритных клеток, гранулоцитов, В-лимфоцитов [12, 13].

Характеристика патогенеза диабета, помимо информации о происхождении инсулинового дефицита, включает также оценку степени нарушения транспортной функции эритроцитов [25].

Существует цитохимический способ прогнозирования СД *in vitro* по кластеризации транспортных рецепторов инсулина на эритроцитах. Под кластеризацией понимают степень насыщенности транспортных рецепторов инсулина на эритроците, неполноценные кластеры не способны транспортировать инсулин. При меньшем количестве рецепторов у кластеров эритроцитов, последние не могут доставить к клеткам пропорционального количества инсулина, что приводит к компенсации углеводного обмена сгущением крови [26].

Заключение. Анализ уровня общего IgE, уровня глюкозы и гликозилированного гемоглобина показал, что 0 (I), А (II), В (III) группы крови демонстрировали разную реактогенность в зависимости от степени нарушения углеводного обмена. Наблюдалась сильная прямая корреляционная зависимость ($r = 0,8$) от антигенов 0 (I) группы крови и заболеваемости СД2. Наибольшая степень корреляции прослеживалась между группой крови А (II) и возникновением СД1 ($r = 1$). Наименьший процент СД и наименьшая корреляционная зависимость ($r = 0,67$) наблюдалась у пациентов с В (III) группой крови.

Подгруппа людей с нарушением углеводного обмена (глюкоза 6,2—7,8 ммоль/л; гликозилированный гемоглобин 5,9—6,9%), не имеющих диагноза «сахарный диабет» (подгруппа 2), характеризовалась резким повышением общего IgE в 2 раза выше верхней границы нормы у 0 (I) и А (II). Однако при глюкозе 8,2—16 ммоль/л; гликозилированном гемоглобине 7—11,3% общий IgE падал на 1,5—2 раза ниже верхней границы нормы (100 кМЕ/л), что ниже, чем у представителей В (III) группы крови этой подгруппы, в 4 раза.

Можно предположить, что всплеск общего IgE у людей с пограничным уровнем глюкозы (6,2—7,8 ммоль/л), гликозилированного гемоглобина (5,9—6,9%) в 0 (I) и А (II) группах крови может быть предиктором возникновения сахарного диабета, а также отражать состояние механизмов компенсации при нарушении толерантности к глюкозе, что демонстрируется у В (III) группы крови, которая наименее подвержена возникновению диабета и имеет высокие цифры уровня общего IgE при выраженной толерантности к глюкозе.

Продолжает оставаться открытым вопрос: в каких случаях высокий уровень глюкозы и высокий уровень общего IgE являются антагонистами и какое патогене-

тическое значение имеет это явление при нарушениях углеводного обмена.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 6—8, 13—19, 24, 25
см. REFERENCES)

2. Медуницин Н.В. Цитокины и аллергия. *Иммунология*. 1999; 5: 5—9.
4. Крекова Ю.В. Изменение функционального состояния иммунной системы у больных различными типами сахарного диабета: Дис. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург; 2002.
5. Галенок В.А., Жук Е.А. Иммуномодулирующая терапия при инсулинзависимом сахарном диабете: проблемы и новые перспективы. *Терапевтический архив*. 1995; 12: 80—4.
9. Слесарев В.И. *Химия. Основы химии живого. Учебник для вузов*. Санкт-Петербург: Хим. издат; 2009.
10. Колотьева Н.А. Малые молекулы в изучении особенностей белок-белковых взаимодействий: Дис. ... канд. мед. наук. М.; 2012.
11. Телесманич Н.Р., Колякина А.В., Ломов Ю.М., Меньшикова Е.А., Миронова А.В. Характеристика адгезивной активности холерных вибрионов на эритроцитах млекопитающих для выбора дополнительного ориентировочного теста их эпидемической значимости. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 7: 45—8.
12. Хаитов Р.М. *Система маркерных антигенов CD.M.: ГЭОТАР-Медиа*; 2013.
20. Роер В.О. Роль Т-клеток в патогенезе сахарного диабета 1 типа: от причин до лечения. *Диабетология*. 2003; 46: 305—21.
21. Хаитов Р.М., ред. *Клиническая аллергология: Руководство для практических врачей*. М.: МЕДпресс-информ; 2002.
22. Антонюк М.В., Новгородцев Т.П., Журавская Н.С. Принципы липотропной немедикаментозной терапии при вторичных дислипидемиях. *Здоровье. Медицинская этиология. Наука*. 2006; 25(1): 34—7.
23. Железничкова Г.Ф. Иммуноглобулин Е: Биологическая роль при инфекционных заболеваниях. *Медицинская иммунология*. 2002; 4(4-5): 515—34.
26. Малюков С.А. Цитохимический способ прогнозирования сахарного диабета. Тула: *Вестник новых медицинских технологий*. 1998; 3-4: 47—8.

REFERENCES

1. Katoh N., Kraft S., Wessendorf J., Bieber T. The high-affinity IgE receptor (FcεRI) blocks apoptosis in normal human monocytes. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 183—190.
2. Medunitsin N.V. Cytokines and allergies. *Immunologiya*. 1999; 5: 5—9. (in Russian)
3. Gao P., Mao X., Baldini M., Roberts M., Adra C., Shirakawa T., Holt P., Matinez F., Hopkin J. Serum total IgE levels and CD14 on chromosome 5q31. *Clin. Genet.* 1999; 56: 164—5.
4. Krekova Yu.V. Changing the function of the immune system in patients with different types of diabetes: Diss. [Izmenenie funktsional'nogo sostoyaniya immunoj sistemy u bol'nykh razlichnymi tipami sakharnogo diabeta]. Diss. ... St. Petersburg; 2002. (in Russian)
5. Galenok V.A., Zhuk E.A. Immunomodulatory therapy with insulin-dependent diabetes mellitus: challenges and new perspectives. *Terapevticheskiy arkhiv*. 1995; 12: 80—4. (in Russian)
6. Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999; 48: 937—42.

7. Mayer A., Rharbaoui F., Thivolet C. Relations between periferal T-cell reactivity to insulin, clinical remission and cytokin production at IDDM. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 2419—24.
8. D'Adamo P.G., Whitney C. *Eat right 4 your type (The individualized diet Solution to Stayng Healthy, living longer and Achieving your ideal weight)*. G.P. Putnam's Sons; 2002.
9. Slesarev V.I. *Chemistry. Fundamentals of living chemistry. Textbook for high schools. [Khimiya. Osnovy khimii zhivogo. Uchebnik dlya vuzov]*. St. Petersburg: Khim. Izdat.; 2009. (in Russian)
10. Kolot'eva N.A. Small molecules in the study of features of protein-protein interactions: Diss. [Malye molekuly v izuchenii osobennostey belok-belkovykh vzaimodeystviy: Dis. kand. med. nauk]. Moscow; 2012. (in Russian)
11. Telesmanich N.R., Kolyakina A.V., Lomov Yu.M., Men'shikova E.A., Mironova A.V. Features adhesive activity of Vibrio cholerae in the red blood cells of mammals to select additional indicative test their epidemic significance. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2008; 7: 45—8. (in Russian)
12. Haitov R.M. *System of marker CD antigens. [Sistema markernykh antigenov CD]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. (in Russian)
13. Arias M., Rey Nores J., Vita N., Stelter F., Borysiewicz L., Ferrara P., Labeta M. The mechanisms controlling activation of naive B cells, their proliferation, Ag receptor affinity maturation, isotype switching, and their fate as memory or plasma cells is not fully elucidated. *J. Immunol.* 2000; 164: 3480—6.
14. Sandford A., Weir T., Pare P. The genetics of Asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 1749—65.
15. Ehigiator H., Stadnyk A., Lee T. Extract of Nippostrongylus brasiliensis stimulates polyclonal type-2 immunoglobulin response by inducing de novo class switch. *Infect. Immunol.* 2000; 68: 4913—22.
16. Jelinek D. Regulation of B lymphocyte differentiation. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2000; 84: 375—85.
17. Jabara H., Loh R., Ramesh N. et al. Sequential switching from μ to ϵ via γ 4 in human B cells stimulated with IL-4 and hydrocortisone. *J. Immunol.* 1993; 151: 4528—33.
18. Kimata H., Fujimoto M. Growth hormone and insulin-like growth factor 1 induce IgE and IgG4 production by human B cells. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 727—32.
19. Klamt S., Vogel M., Hiemisch A., Prensel F., Zachariae S., Ceglari U., Thiery I., Kiess W. «Association between IgE mediated allergies and diabetes mellitus tupe 1 in children and adolescents». *Pediatric Diadetes*. 2015; 16: 493—503.
20. Roer V.O. The role of T cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from causes to treatment. *Diabetologiya*. 2003; 46: 305—21. (in Russian)
21. Haitov R.M., eds. *Clinical Allergology: A Guide for Practitioners [Klinicheskaya allergologiya: Rukovodstvo dlya prakticheskikh vrachey]*. Moscow: MEDpress-inform; 2002. (in Russian)
22. Antonjuk M.V., Novgorodcev T.P., Principles lipotropic non-pharmacological treatment in secondary dyslipidemia. *Zdorov'e. Meditsinskaya etiologiya. Nauka*. 2006; 25(1): 34—7. (in Russian)
23. Zhelezniczkova G.F. Immunoglobulin E: The biological role in infectious diseases. *Meditsinskaya immunologiya*. 2002; 4(4-5): 515—34. (in Russian)
24. Kershaw M., Darcy P., Trapani J., MacGregor D., Smyth M. Tumor-specific IgE-mediated inhibition of human colorectal carcinoma xenograft growth. *Oncol. Res.* 1998; 10: 133—42.
25. Robinson T.J., Archer J.A., Gambhir K.K., Hollis V.W., Cartey J. Eritrocites a new cell type for the evaluabion of insulin receptors in diabetic humans. *Sciens*. 1979; 205(4402): 200—2.
26. Malyukov S.A. Cytochemical prediction method of diabetes. *Tula: Vestnik novykh medicinskikh tehnologiy*. 1998; 3-4: 47—8. (in Russian)

Поступила 07.03.17
Принята к печати 20.03.17

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 617-001.34-078.33

Курчевенко С.И.¹, Бодиенкова Г.М.^{1,2}

ДОНОЗОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВИБРАЦИОННОЙ БОЛЕЗНИ

¹ ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», 665827, Ангарск, Россия;

² ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет», Иркутск, Россия

Вибрационная болезнь (ВБ) занимает одно из ведущих мест среди профессиональных заболеваний. Для снижения вибрационной патологии и уменьшения случаев инвалидизации необходимо раннее доклиническое выявление вредного воздействия вибрации на организм рабочего. Цель работы — разработка способа диагностики ранних признаков нарушения здоровья работающих при воздействии локальной вибрации. Методом иммуноферментного анализа проведено иммунологическое обследование 40 мужчин, стажированных рабочих в контакте с локальной вибрацией. У стажированных работников с доклиническими признаками нарушений здоровья от воздействия вибрации установлены изменения в содержании иммуноглобулинов и цитокинов, характеризующиеся снижением концентраций IgA, IgM, TNFα, а также усилением продукции провоспалительного цитокина IL-1β и противовоспалительного цитокина IL-4. Выявлено возрастание сывороточных концентраций нейроспецифического белка S-100β. В результате многомерного дискриминантного анализа обоснованы информативные показатели для диагностики ранних признаков развития ВБ — TNFα и белок S-100β. Предлагаемый способ позволяет выявить ранние признаки нарушения здоровья у рабочих, контактирующих с локальной вибрацией, при использовании минимального числа наиболее информативных диагностических показателей, что способствует уменьшению объема клинических исследований.

Ключевые слова: воздействия вибрации; вибрационная болезнь; иммунологические показатели; информативные биомаркеры.

Для цитирования: Курчевенко С.И., Бодиенкова Г.М. Донозологическая диагностика вибрационной болезни. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (8): 482-485. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-482-485>

Kurchevenco S.I.¹, Bodienkova G.M.^{1,2}

THE PRE-NOSOLOGIC DIAGNOSTIC OF VIBRATION DISEASE

¹The Vostochno-Sibirskii institute of medical ecological research, 665827 Angarsk, Russia

²The Irkutskii national research technical institute, Irkutsk, Russia

The vibration disease occupies one of leading places among occupational diseases. To decrease vibration pathology and to diminish number of cases of disability an early pre-clinical detection of harmful effect of vibration on organism of worker is needed. The purpose of study is to develop mode of diagnostic of early indications of health disorders of working individuals under local vibration impact. The immune enzyme technique was applied to immunologically examine 40 males workers in contact with local vibration. In workers with pre-clinical indications of health disorders due to effect of vibration alterations were established concerning content of immunoglobulins and cytokines characterized by lowering of concentrations of IgA, IgM, TNFα and also increasing of production of pro-inflammatory cytokine IL-1β and anti-inflammatory cytokine IL-4. The increasing of serum concentrations of neuro-specific protein S-100β is established. The proposed mode permits detecting early indications of health disorders in workers contacting with local vibration in condition of applying minimal number of the most informative diagnostic indices that promotes decreasing of volume of clinical analyses.

Key words: vibration effect; vibration disease; immunological indices; informative biomarkers.

For citation: Kurchevenco S.I., Bodienkova G.M. The pre-nosologic diagnostic of vibration disease. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (8): 482-485. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-482-485>

For correspondence: Kurchevenco S.I., candidate of medical sciences, researcher of the laboratory of immunologic biochemical and molecular genetic studies in hygiene. e-mail: immun11@yandex.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.11.2016
Accepted 29.11.2016

Введение. Вибрационная болезнь (ВБ) — профессиональное заболевание, развивающееся после длительного воздействия вибрации (через 5—7 лет), с преимущественным поражением нервной системы и опорно-двигательного аппарата у рабочих [1]. Под действием вибрации в организме происходят различные изменения на молекулярном и клеточном

уровнях. Изменяются уровни иммунологических маркеров, показателей окислительного метаболизма, периферической крови, кислотно-основного состояния и функциональной активности нейтрофилов, реологические свойства крови, повышается перекисный гемолиз эритроцитов, изменяются гормональный статус и липидный обмен и др. Использование всех (более 100) или большого числа лабораторных тестов для диагностики вредного воздействия вибрации — трудоемкое и дорогостоящее мероприятие, в котором нет обязательной необходимости, так как не все тесты характеризуются высокой диагностической информативностью [2].

Многочисленные лабораторные и натурные исследова-

Для корреспонденции: Курчевенко Светлана Ивановна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ «ВСИМЭИ»; e-mail: immun11@yandex.ru

Таблица 1

Сравнительная оценка иммунологических показателей у обследуемых лиц, Ме (Q25—Q75)

Показатели	Стажированные работники с доклиническими признаками нарушения здоровья от воздействия локальной вибрации (n = 40)	Контрольная группа (n = 46)
IgA, мг/мл	1,7 (1,45—1,86)*	1,9 (1,37—4,2)
IgM, мг/мл	1,10 (0,82—1,37)*	1,4 (1,02—3,2)
IgG, мг/мл	11,17 (7,00—17,59)	12,97 (9,6—21,22)
IL-1β, пг/мл	1,64 (0,1—1,15)*	0,01 (0,01—1,17)
TNFα, пг/мл	0,69 (0,01—0,23)*	0,89 (0,12—2,42)
IL-4, пг/мл	2,9 (0,01—0,01)*	0,1 (0,1—8,8)
Белок S-100β, нг/мл	88,1 (77,15—102,85)*	65,7 (58,2—68,7)

Примечание. * — различия между группами статистически значимы при $p < 0,05$.

ния [1, 3, 4] позволили сформировать научную концепцию, согласно которой патогенетические механизмы воздействия вибрации обусловлены сложным, рефлекторно развивающимся комплексом изменений в функциональном состоянии различных отделов центральной нервной системы (ЦНС) и вегетативно-гуморальными сдвигами. Для снижения вибрационной патологии и уменьшения случаев инвалидизации необходимо раннее доклиническое выявление вредного воздействия вибрации на организм рабочего [3]. Диагностика ВБ до настоящего времени во многом базируется на методиках, основанных на субъективном восприятии самого больного. Именно поэтому при диагностике ВБ помимо выяснения анамнеза и санитарно-гигиенической характеристики условий труда необходимо объективное клиничко-лабораторное обследование пациента с позиций доказательной медицины [1, 4]. В настоящее время высокую диагностическую значимость при ВБ отводят электронейромиографическим исследованиям [5]. Однако эти методики имеют недостаточно высокую точность диагностики профессиональной ВБ на ранних этапах заболевания, которое характеризуется, прежде всего, развитием двух синдромов — периферического ангиодистонического и синдрома вегетативно-сенсорной (сенсорной) полиневропатии. Один из эффективных путей снижения заболеваемости вибрационной патологией — раннее выявление рабочих с признаками негативного воздействия вибрации на организм и своевременное предотвращение развития заболевания. В настоящее время продолжается работа по поиску и обоснованию наиболее информативных биомаркеров для оценки эффектов действия вибрации на организм человека [4]. Кроме того, в последние годы появилось значительное количество доказательств о важной роли иммунной системы в патогенезе ВБ. Так, например, определение содержания цитокинов в различных биологических жидкостях имеет большое значение в оценке функциональной активности иммунокомпетентных клеток и регуляции иммунного ответа. В отдельных случаях (септический шок, бактериальный менингит), когда цитокины, в частности TNFα, выступают в качестве ведущего фактора патогенеза, определение его содержания в крови или спинномозговой жидкости становится основным методом иммунологической диагностики [6].

Цель исследования — разработка способа диагностики ранних признаков нарушения здоровья работающих при воздействии локальной вибрации.

Материал и методы. Всего обследовано 86 мужчин. Из них 40 — стажированных работников с доклиническими признаками нарушений здоровья от воздействия вибрации, которые были установлены врачами клиники ФГБНУ «ВСИМЭИ» с помощью функциональных методов исследования (электронейромиография и электроэнцефалография). Средний возраст обследованных работников составил $35,8 \pm 1,2$ года, стаж работы в контакте с вибрацией — $9,9 \pm 0,6$ года. По данным контроля, проводимого в лаборатории эколого-гигиенических исследований (ФГБНУ «ВСИМЭИ»), на рабочих местах установлено превышение предельно допустимого уровня (ПДУ) вибрации в октавных полосах:

— частот 16—250 Гц — до 17 дБ с максимумом колебательной энергии в октавной полосе 31,5 Гц на рукоятках клепальных молотков, пневмодрелей, канговых дрелей;

— частот 63—1000 Гц — на 1—17 дБ на рукоятках бор-машин.

Рассчитанный эквивалентный скорректированный уровень вибрации с учетом ее интенсивности и длительности за рабочую смену составил 124 дБ [7].

Контрольную группу составили 46 «условно здоровых» мужчин, сопоставимых по возрасту и общему трудовому стажу, не имеющих в профессиональном маршруте контакта с вибрацией.

Методом иммуноферментного анализа у пациентов в сыворотке крови определено содержание цитокинов IL-1β, IL-4,

TNFα (тест-системы ЗАО «Вектор Бест», Новосибирск), IgA, IgM, IgG (тест-системы ЗАО «Вектор Бест», Новосибирск), белка S-100β (тест-система фирмы CapAg, Швеция). Анализ иммунологических показателей выполнен на автоматическом анализаторе Q.S. «Alisei», позволяющем проводить измерения оптической плотности раствора в лунках планшета при длине волны 450 нм, 620—654 нм.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. Для всех имеющихся выборок проверяли гипотезу нормальности распределения по критерию Шапиро—Уилкса. В случае отсутствия правильного распределения использовали непараметрические методы с использованием критерия Манна—Уитни. Интерквартильный анализ выполняли с вычислением медианы (Me), верхнего и нижнего квартилей (Q25—Q75). Для дискриминантного анализа использовали модуль «Discriminant analysis». Информативность анализируемых показателей оценивали шаговыми процедурами; граничным значением F включения выбрана величина $F = 3,0$; критерием классификации служила мера D^2 Махаланобиса. Уровень значимости был принят как $p < 0,05$.

Работа не ущемляет права и не подвергает опасности благополучия обследованных рабочих в соответствии с требованиями биомедицинской этики, утвержденными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2000). Исследования выполнены с согласия пациентов в клинике института.

Результаты и обсуждение. Результаты клиничко-иммунологического обследования у стажированных рабочих с доклиническими признаками нарушений здоровья от воздействия вибрации и группы контроля приведены в табл. 1.

Из представленных данных следует, что у стажированных работников без признаков нарушения здоровья от воздействия вибрации выявлено статистически значимое снижение концентраций IgA ($p = 0,03$) и IgM ($p = 0,004$) в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой. Следует отметить, что IgM появляются на первом этапе иммунного ответа и находятся преимущественно в сосудистом русле. В связи с этим IgM играют важную защитную роль на ранних стадиях заболева-

Таблица 2

Информативные показатели дискриминантного анализа у стажированных рабочих, подвергающихся воздействию локальной вибрации, и контрольной группы, не контактирующих с вибрацией

№	Показатели	F-включения	p
A1	TNFα, пг/мл	3,117 713	0,000 000 01
A2	Белок S-100β, нг/мл	4,425 184	0,001 082

ния. Снижение продукции IgM может свидетельствовать о недостаточности гуморального иммунитета, нарушении синтеза или усилении катаболизма этих иммуноглобулинов, а также адсорбции их на иммунных комплексах при воспалительных процессах [8]. Учитывая, что действие цитокинов тесно связано с физиологическими и патофизиологическими реакциями, в основном иммунной системы организма, нами было предпринята попытка оценить цитокиновый профиль у стажированных рабочих на ранней стадии развития ВБ. Установлено увеличение продукции IL-1 β в сыворотке периферической крови в 164 раза ($p = 0,0014$) по сравнению с контрольной группой. Длительное возрастание уровня провоспалительного цитокина IL-1 β может способствовать формированию условий для хронизации/прогрессирования патологического процесса [9]. При исследовании провоспалительного цитокина TNF α определено снижение его уровня относительно контрольной группы ($p = 0,0001$). Выявленный дисбаланс цитокинов может стать основой развития заболеваний и в дальнейшем выступать фактором, отягощающим их течение.

Вместе с тем, противовоспалительный IL-4, регулирующий развитие специфических иммунных реакций и вырабатывающийся Т-хелперами типа Th2, увеличивается в 29 раз в группе стажированных рабочих по сравнению с контрольной группой ($p = 0,000001$), что ведет к преобладанию гуморального типа иммунного ответа на антигены. По современным данным, IL-4 в комплексе с гамма-интерфероном служит ключевым фактором, определяющим тип иммунитета [9].

Известно, что важнейшая функция системы цитокинов — обеспечение согласованного действия иммунной, эндокринной и нервной систем в ответ на стресс. В ходе исследования белка S-100 β — одного из маркеров, позволяющих проследить изменения в ЦНС, выявлено увеличение содержания его у стажированных работников в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой ($p = 0,001$). Согласно литературным данным [10], белок S-100 выполняет внутриклеточное и экстраклеточное регулирование многих процессов, обеспечивает рост и подвижность клеток, участвует в регуляции клеточного цикла. Этот белок принимает участие в механизмах транскрипции и дифференциации, в энергетическом метаболизме, а также во многих других жизненно важных процессах, обеспечивающих жизнеспособность клетки. Установлено, что наиболее специфичный для мозга белок S-100 β через фосфорилирование других белков участвует в передаче сигнала, обеспечивая тем самым пластические процессы [11]. Увеличение концентрации S-100($\alpha\beta$) и S-100 ($\beta\beta$) в спинномозговой жидкости и плазме служит маркером повреждения головного мозга [12, 13].

На следующем этапе исследований определенный интерес представляло проведение многомерного дискриминантного анализа. Результаты анализа позволили обосновать наиболее информативные иммунологические показатели в диагностике начальных проявлений ВБ [14] (табл. 2).

Оценку эффективности предлагаемого способа донозологической диагностики проводили в группе стажированных рабочих и контрольной группе. В выборке стажированных рабочих (46 человек) правильное распознавание составило 100%, для контрольной группы, не контактирующих в процессе производственной деятельности с профессиональной вредностью (40 человек), — 95%.

На основании регистрации вышеперечисленных иммунологических показателей появляется возможность диагностики ранних признаков нарушения здоровья от воздействия локальной вибрации.

Заключение. Таким образом, выявлены нарушения иммунореактивности организма стажированных работников с доклиническими признаками нарушений здоровья от воздействия вибрации (снижение уровней Ig A, IgM и провоспалительного цитокина TNF α , повышение уровней провоспалительного цитокина IL-1 β и противовоспалительного цитокина IL-4), а также определены наиболее информативные показа-

тели (TNF α , белок S-100 β) в донозологической диагностике ранних признаков развития ВБ. Предлагаемый способ позволяет установить ранние признаки нарушения здоровья у рабочих, контактирующих с локальной вибрацией, при использовании минимального числа наиболее информативных диагностических показателей, что способствует уменьшению объема клинических исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коробчанский В.А., Новикова И.В., Герасименко О.И. Биохимические критерии донозологической и ранней диагностики вибрационной болезни под воздействием локальной вибрации. *Медицина сьогодні і завтра*. 2011; (4): 139—44.
2. Антошина Л.И., Павловская Н.А., Яцына И.В. Информативные лабораторные биомаркеры для выявления негативного воздействия вибрации на организм рабочих. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(1): 19—3.
3. Крючкова Е.Н., Антошина Л.И., Жеглова А.В., Сааркопель Л.М. Критериальная значимость показателей оксидативного стресса при вибрационном воздействии. *Медицина труда и промышленная экология*. 2016; (3): 30—4.
4. Павловская Н.А., Антошина Л.И. Выбор лабораторных биомаркеров для раннего выявления неблагоприятного действия вибрации на организм. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; (1): 13—5.
5. Трошин В.В., Морозова П.Н. Боль и параметры электромиографии при вибрационной болезни. *Медицина труда и промышленная экология*. 2013; (2): 24—8.
6. Орадова А.Ш., Устенова Г.О., Стабаева Г.С. Методы исследования цитокинов (обзор литературы). *Медицина (Казахстан)*. 2014; (10): 84—7.
7. Рукавишников В.С., Панков В.А., Кулешова М.В., Русанова Д.В., Картапольцева Н.В., Судакова Н.Г. и др. Итоги и перспективы изучения профессиональных заболеваний у рабочих авиастроительной промышленности в Восточной Сибири. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2012; (1): 105—12.
8. Ярили А.А. *Иммунология*. М.: ГЭОТАР — Медиа; 2010.
9. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. *Цитокины*. СПб.; 2008.
10. Клиническое значение определения нейроспецифических белков в сыворотке крови больных с опухолями головного мозга. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; (10): 40—2.
11. Шаймарданова Г.Ф., Мухамедшина Я.О., Чельшев Ю.А. Оценка эффективности путей локальной доставки терапевтических генов при травме спинного мозга крысы: корреляция параметров структуры и функции. *Современные технологии в медицине*. 2013; 5(3): 16—20.
12. Григорьев Е.В., Вавин Г.В., Гришанова Т.Г., Будаев А.В., Дербенева О.А. Нейроспецифические белки — маркеры энцефалопатии при тяжелой сочетанной травме. *Медицина неотложных состояний*. 2010; (2): 91—5.
13. Морозова Ю.А., Камчатнов П.Р., Ахметжанова Л.Л. Содержание белка S-100 и фактора некроза опухоли альфа в сыворотке крови больных дисциркуляторной энцефалопатией. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова*. 2009; 109(5): 53—6.
14. Бодиевкова Г.М., Курчевенко С.И. *Способ донозологической диагностики нарушения здоровья от воздействия вибрации*. Патент РФ № 2549435; 2015.

REFERENCES

1. Korobchanskiy V.A., Novikova I.V., Gerasimenko O.I. Biochemical criteria of preclinical and early diagnostics of vibration disease under the influence of local vibration. *Meditsina s'ogodni i zavtra (Ukrainian)*. 2011; (4): 139—44. (in Russian)
2. Antoshina L.I., Pavlovskaya N.A., Yatsyna I.V. Informative laboratory biomarkers for the detection of adverse effects of vibration on the body of the workers. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(1): 19—3. (in Russian)
3. Kryuchkova E.N., Antoshina L.I., Zheglova A.V., Saarkoppel' L.M. Kriteriaalnaya importance of indicators of oxidative stress when exposed to vibration. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2016; (3): 30—4. (in Russian)
4. Pavlovskaya N.A., Antoshina L.I. The choice of laboratory biomarkers for early detection of adverse effects of vibration on the body. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; (1): 13—5. (in Russian)
5. Troshin V.V., Morozova P.N. The pain and electromyographic parameters in vibration disease. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2013; (2): 24—8. (in Russian)

6. Oradova A.Sh., Ustenova G.O., Stabaeva G.S. Methods of study of cytokines (review). *Meditsina (Kazakhstan)*. 2014; (10): 84—7. (in Russian)
7. Rukavishnikov V.S., Pankov V.A., Kuleshova M.V., Rusanova D.V., Kartapol'tseva N.V., Sudakova N.G. et al. Results and prospects of the study of occupational diseases among workers in the aircraft industry in Eastern Siberia. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2012; (1): 105—12. (in Russian)
8. Yarin A.A. *Immunology [Immunologiya]*. Moscow: GEOTAR — Media; 2010. (in Russian)
9. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. *Cytokines [Tsitokiny]*. St.Petersburg; 2008. (in Russian)
10. Lyubimova N.V., Toms M.G., Fu R.G., Bondarenko Yu.V. The clinical significance of determining neurospecific proteins in the serum of patients with brain tumors. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; (10): 40—2. (in Russian)
11. Shaymardanova G.F., Mukhamedshina Ya.O., Chelyshev Yu.A. The Assessment of Efficiency of Local Delivery Pathways of Therapeutic Genes in Murine Spinal Cord Injury: Correlation of Structure and Function Parameters. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2013; 5(3): 16—20. (in Russian)
12. Grigor'ev E.V., Vavin G.V., Grishanova T.G., Budaev A.V., Derbeneva O.A. Neuron proteins — markers encephalopathy with severe concomitant injury. *Meditsina neotlozhnykh sostoyaniy*. 2010; (2): 91—5. (in Russian)
13. Morozova Yu.A., Kamchatnov P.R., Akhmetzhanova L.L. The protein content of S-100 and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with circulatory encephalopathy. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2009; 109(5): 53—6. (in Russian)
14. Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I. *The Method of Preclinical Diagnosis of Health Problems from Exposure to Vibration*. Patent RF № 2549435; 2015. (in Russian)

Поступила 17.11.16

Принята к печати 29.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-002.78-078.33-074:543.42.062

Набиева Д.А.¹, Арипов А.Н.²

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОМНЫХ МАРКЕРОВ И ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ И ИХ СВЯЗЬ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ У БОЛЬНЫХ ПОДАГРОЙ

¹Ташкентская медицинская академия, 100109, Ташкент, Республика Узбекистан;

²Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр педиатрии, 100179, Ташкент, Республика Узбекистан

Современное представление о подагре включает в себя как традиционную метаболическую теорию нарушения пуринового обмена и внешнесредовое воздействие, так и участие иммунновоспалительных, генетических и протеомных факторов. Проведенное протеомное исследование больных тофусной подагрой и людей с бессимптомной гиперурикемией методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией, а также иммунологическое профилирование позволили определить специфические протеомные маркеры подагры — циркулирующий интерлейкин-8 (IL-8)/CXCL8 и ассоциированный гетеродимерный комплекс миелоид-связанных белков MRP8/MRP14 (калгранулин A/B). Выявлена положительная корреляция со сдвигами метаболических показателей — компонентами липидного спектра и уровня мочевой кислоты как у больных тофусной подагрой, так и (в меньшей степени) у людей с бессимптомной гиперурикемией. Предлагается рассмотреть биомаркеры IL-8 и MRP8/MRP14 в качестве независимых предикторов развития метаболических сдвигов и кардиоваскулярной патологии у больных подагрой.

Ключевые слова: масс-спектрометрия; иммунологический профиль; IL-8; MRP8/MRP14; подагра; гиперурикемия.

Для цитирования: Набиева Д.А., Арипов А.Н. Определение протеомных маркеров и иммунологического профиля и их связь с метаболическими параметрами у больных подагрой. *Клиническая и лабораторная диагностика*. 2017; 62 (8): 485-489. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-8-485-489>

Nabieva D.A.¹, Aripov A.N.²

THE DETECTION OF PROTEOMIC MARKERS AND IMMUNOLOGIC PROFILE AND THEIR RELATIONSHIP WITH METABOLIC PARAMETERS IN PATIENTS WITH GOUT

¹The Tashkent medical academy, 100109 Tashkent, the Republic of Uzbekistan

²The Republican specialized R&D production medical center of pediatrics, 100179 Tashkent, the Republic of Uzbekistan

The actual concept of gout comprises both traditional metabolic theory of disorder of purine metabolism and external medium impact and involvement of immune inflammatory, genetic and proteomic factors. The proteomic study of patients with tofus gout and patients with asymptomatic hyperuricosuria was carried out using technique of fluid chromatography with mass-spectrometry and immunologic profiling. The specific proteomic markers of gout such as circulating interleukin-8 (IL-8)/CXCL8 and associated heterodimeric complex of myeloid-bound proteins MRP8/MRP14 (kalgranulin A/B) were established. The positive correlation was established concerning shifting of metabolic indices - components of lipid spectrum and level of uric acid both in patients with tofus gout and in lesser degree in patients with asymptomatic hyperuricosuria. It is proposed to consider biomarkers IL-8 and MRP8/MRP14 as independent predictor of development of metabolic shifting and cardiovascular pathology in patients with gout.

Key words: mass-spectrometry; immunologic profile; IL-8; MRP8/MRP14; gout; hyperuricosuria

For citation: Nabieva D.A., Aripov A.N. The detection of proteomic markers and immunologic profile and their relationship with metabolic parameters in patients with gout. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (8): 485-489. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-485-489>

Для корреспонденции: Набиева Дилдора Абдумаликовна, канд. мед. наук, доц.; e-mail: dil_nab@mail.ru

For correspondence: *Nabieva D.A.*, candidate of medical sciences, associate professor. e-mail:

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 30.03.2017
Accepted 15.04.2017

Введение. Подагра — полигенное заболевание пуринового обмена, сопровождающееся отложением кристаллов солей моноурата натрия (МУН) в различных тканях и воспалительным фоном [1], поражает 1—6% взрослого населения в развитых странах и представляет собой наиболее часто встречающийся у мужчин тип артрита [1, 2]. Актуальная доказательная база свидетельствует о том, что заболеваемость подагрой многократно увеличилась за последние десятилетия и продолжает неуклонно расти на фоне напряженной эпидемиологической обстановки по неинфекционным заболеваниям, таким как метаболический синдром, гипертоническая болезнь (ГБ), ишемическая болезнь сердца (ИБС), сахарный диабет 2-го типа и их осложнения [2].

Более 70% больных подагрой имеют более 2 факторов риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [3], при этом риск развития ИБС или цереброваскулярной болезни (ЦВБ) у людей с гиперурикемией повышен в 3—5 раз по сравнению с пациентами с нормоурикемией [4]. Связь с накоплением в тканях кристаллов уратов (тофусами), хронической почечной недостаточностью, метаболическим синдромом, неалкогольной жировой болезнью печени (НЖБП) и повышенным риском ССЗ [4, 5] позволяет рассматривать подагру не только как локализованное поражение суставов и околоуставных тканей, но и как мультиорганное заболевание.

Геномные исследования (транскриптомика (экспрессия мРНК) и эпигенетика (метилирование ДНК, модификация гистонов и микроРНК)) позволили выявить мутации определенных генов-транспортеров мочевины (hURAT1), АТФ-связывающего кассетного транспортера G2 (ABCG2), SLC17A1-SLC17A3, а также генов, кодирующих воспалительные цитокины (ген *251T/A IL-8*, *1188A/C IL-12B*, *rs10889677 IL-23R* и др.) [5, 6], которые в совокупности определяют прогрессирование фоновой гиперурикемии в манифестирующий подагрический артрит и развитие фоновых метаболических заболеваний (гипертоническая болезнь, поражение почек, кардиоваскулярная патология и сахарный диабет 2-го типа) [4].

Тем не менее, последние тенденции в области «прецизионной медицины» (precision medicine) указывают на то, что патологические процессы, протекающие в организме на клеточном уровне, невозможно полностью отразить, основываясь только на геномных исследованиях [7]. Таргетные протеомные и метаболомные исследования позволяют проводить идентификацию и количественную оценку белков и метаболитов с целью поиска диагностических биомаркеров, идентификации точек приложения терапевтического воздействия и разработки методов оценки эффективности терапии.

Благодаря ряду иммуногистохимических исследований *in vitro* и протеомных исследований выявлено, что кристаллы МУН оказывают прямое провоспалительное действие, индуцируя продукцию цитокинов, таких как IL-1 β , путем включения семейства толл-подобных рецепторов и ряда инфлам-масом в воспалительный каскад [8]. Имеются также данные о роли комплекса миелоид-связанных белков MRP8/MRP14, также известного как калгранулин А/В (S100A8/A9), который является агонистом толл-подобных рецепторов TLR-4, в повышении риска ССЗ и сахарного диабета 2-го типа у пациентов с гиперурикемией и развитием у них НЖБП [9, 10]. Кроме того, кристаллы МУН ответственны за индукцию выработки цитозольного белка NALP3 (крипипина), основного компонента одноименных провоспалительных каспаза-

1-активирующих инфлам-масом [11], которые запускают продукцию активных цитокинов IL-1 β и IL-18 [12].

Эти данные позволяют предположить наличие таргетных воспалительных биомаркеров у больных подагрой, обуславливающих не только патогенез основного подагрического артрита, но и развитие коморбидных состояний.

Цель данной работы — исследование основных биомаркеров методом масс-селективной спектрометрии (МС) и определение их корреляции с основными метаболическими показателями у больных тофусной подагрой и бессимптомной гиперурикемией.

Материал и методы. Обследованы больные подагрой ($n = 178$, все мужского пола, средний возраст $54,2 \pm 6,1$ года), поступившие в ревматологическое отделение и поликлинику специализированного курсового амбулаторного лечения 1-й клиники Ташкентской медицинской академии в период с 2012 по 2016 г. с клинически верифицированным диагнозом: «подагра» по критериям S.L. Wallace (1977) [13]. На момент первого осмотра у 42 больных (23,6%) был диагностирован острый подагрический артрит, у 69 больных (38,8%) артрит носил затяжной характер с длительностью от 3 нед до 3 мес, у 67 пациентов (37,6%) диагностирован хронический артрит длительностью более 3 мес. Все пациенты прошли общеклинические и специальные биохимические исследования, включающие определение в сыворотке крови уровней холестерина (ХС), липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), липопротеидов низкой плотности (ЛПНП), липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП), триглицеридов (ТГ), глюкозы, мочевины, мочевины, креатинина, общего белка, аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), С-реактивного белка (СРБ).

Из 178 больных в основную группу для проведения иммунологического исследования и протеомного анализа методом МС было отобрано 20 человек с клинически верифицированным диагнозом «подагра» с тофусами в межприступный период подагрического артрита, а также 14 пациентов с бессимптомной гиперурикемией в качестве группы контроля. Все больные были сопоставимы по возрасту ($53,8 \pm 2,1$ года), длительности заболевания ($5,1 \pm 1,2$ года), принимаемым лекарственными препаратами и наличию сопутствующих заболеваний. Критериями исключения к проведению исследования были наличие хронических очагов инфекции и активные инфекционные заболевания. Также исключался прием любых антибактериальных, противовирусных, противогрибковых и противопаразитарных препаратов, пребиотических и пробиотических средств в течение всего периода исследования.

У 30 отобранных пациентов перед проведением МС-анализа методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрации интерлейкина-1 β (IL-1 β), фактора некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-8 (IL-8), интерлейкина-10 (IL-10), интерлейкина-20 (IL-20) в сыворотке крови.

Забор венозной крови проводили утром натощак. После забора образцы крови подвергали центрифугированию в течение 15 мин при угловой скорости вращения 3000 об/мин. Далее сыворотка пипетировалась и распределялась в 2 стерильные пробирки с герметично закупоренными крышками ($\geq 0,5$ мл сыворотки). После маркировки пробирки замораживались и хранились при температуре -15 — -20°C . Образцы сыворотки крови перед анализом размораживали при температуре лаборатории, в вials помещали до 1 мл сыворотки крови, 2 мл метил-трет-

Таблица 1

Фенотипическая и клиническая характеристика исследуемых групп

Показатели	Больные тофусной подагрой (n = 20)	Пациенты с бессимптомной гиперурикемией (n = 14)
Возраст, годы	52,6 ± 3,2	54,4 ± 1,7
Длительность заболевания, годы	5,1 ± 1,2	—
Артериальная гипертензия, %	8 (40)	5 (35,7)
Сердечно-сосудистая патология, %*	11 (46,6)	5 (35,7)
Хроническая болезнь почек, %**	5 (25)	1 (7,1)
Неалкогольная жировая болезнь печени, %	8 (40)	3 (21,4)
Аллопуринол, %	13 (65)	5 (35,7)
Фебуксостат, %	3 (15)	3 (21,4)
Колхицин, %	1 (5)	—
Глюкокортикостероиды, %	2 (10)	—
Нестероидные противовоспалительные средства, %	13 (65)	1 (7,1)

Примечание. * — включая транзиторную ишемическую атаку, инфаркт миокарда, поражение периферических сосудов, аритмии, ишемическую болезнь сердца и/или сердечную недостаточность; ** — при скорости клубочковой фильтрации ниже 60 мл/мин.

бутилового эфира с 50 мкл 5% раствора метановой кислоты. Полученную смесь перемешивали в течение 5 мин на ротаторе. Образовавшуюся эмульсию переносили в пробирки и центрифугировали при 8000 об./мин в течение 10 мин. Верхний эфирный слой переносили в посуду и высушивали стерильным воздухом. Разделение фаз проводили на жидкостном хроматографе с масс-спектрометром Agilent 6420 Triple Quadrupole LC/MS (Agilent, Германия) в режиме программирования температуры, начиная с температуры +50°C (3 мин). Дальнейшая скорость нагрева составляла 10°C в мин, конечная температура –290°C, время при конечной температуре 10 мин.

Статистическую обработку проводили путем вычисления коэффициентов корреляции по Пирсону. Белки-биомаркеры по результатам жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC/MS) были иерархически сгруппированы в программе TagIdent (ExPASy) для идентификации потенциальных белков, соответствующих отношениям вес/заряд, по молекулярным массам (±1%) каждого белка. Иерархическую кластеризацию и статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения Eri Info версии 6.0. Для сравнения корреляции с метаболическими показателями применяли *t*-критерий, скорректированные значения *p* рассчитывали автоматически по достижении пределов доверительного интервала.

Результаты и обсуждение. Фенотипическая характеристика обследуемых больных и соотношение лекарственных препаратов, принимаемых для базисного лечения, приводятся в табл. 1. У больных тофусной подагрой чаще, чем в группе с бессимптомной гиперурикемией, отмечаются эпизоды кардиоваскулярной патологии (+10,9%), поражения гломерулярного аппарата и ухудшение фильтрационной способности почек (+17,9%), а также ультразвуковые признаки неалкогольного жирового поражения печени (+18,6%).

В межприступный период подагрического артрита отмечается более частый прием урикозурических препаратов (аллопуринол, фебуксостат) по показаниям, а также глюкокортикостероидов преимущественно при артралгии, резистентной к нестероидным противовоспалительным препаратам. Прием указанных препаратов на период иммунологических

и протеомных исследований был приостановлен с целью получения достоверных результатов.

Изученные показатели уровней мочевой кислоты и липидного профиля у больных подагрой и обследуемых с бессимптомной гиперурикемией представлены в табл. 2.

Данные, приведенные в табл. 3, указывают на достоверную разницу в показателях гиперурикемии у больных с тофусной формой подагры (повышение на 14,8%) в сравнении с бессимптомными пациентами. У пациентов с подагрой в динамике липидного профиля отмечается увеличение содержания ХС на 14,7%, ЛПНП — на 22,5, ЛПОНП — на 21,4, ТГ — на 20,6 и снижение уровня ЛПВП на 21% (*p* < 0,05). Коэффициент атерогенности выше в группе больных подагрой на 38,6% (*p* = 0,029). Обнаруженная гиперхолестеринемия у больных с тофусной формой подагры в сравнении с показателями пациентов без подагрического артрита ассоциировалась с более выраженной дислипидемией и атерогенной триглицеридемией (*p* = 0,008).

В отличие от обследуемых с бессимптомной гиперурикемией, у пациентов в межприступный период подагры происходило существенное увеличение продукции ключевых провоспалительных цитокинов IL-8, IL-10. При этом не отмечалось ожидаемого и достоверного повышения IL-1β, TNF-α, а также продуцируемого активированными CD4 + Т-лимфоцитами IL-4 (*p* = 0,0028). Также отсутствовала положительная коррелятивная связь между повышенным уровнем циркулирующего IL-8 и острофазных показателей воспаления — СРБ и скоростью оседания эритроцитов (*p* = 0,012). Результаты по титрам IL-2, TNF-α, IL-6, IL-20 варьировали в широких пределах и превышали установленный доверительный интервал, по-видимому, вследствие малой выборки объектов иммунологического исследования и отсутствия прогностически значимой тенденции показателей. Поскольку ожидаемое повышение уровня циркулирующих IL-8 не коррелирует с уровнем цитокинов IL-1β и TNF-α, протеомное исследование представляет собой наиболее эффективный метод определения титра потенциальных биомаркеров, сопровождающих повышенный уровень циркулирующего IL-8. С целью оптимизации протокола протеомного исследования, было решено провести масс-спектрометрический анализ субпопуляций белков у 10 больных с наибольшим (>50 пг/мл) и 10 обследуемых с наименьшим (<10 пг/мл) титром IL-8. Профили экспрессии белков по результатам масс-спектрометрии содержат четко различимые разделенные субпопуляции потенциальных белков, дифференциально экспрессированные между 10 пациентами с низким (<10 пг/мл) и 10 — с высоким (>50 пг/мл) уровнем экспрессии IL-8.

Таблица 2

Показатели уровня мочевой кислоты и липидного профиля (M ± m)

Показатели	Больные тофусной подагрой (n = 20)	Пациенты с бессимптомной гиперурикемией (n = 14)
Мочевая кислота, ммоль/л	0,69 ± 0,015	0,46 ± 0,017
Общий холестерин, ммоль/л	6,92 ± 0,016	5,90 ± 0,016
Липопротеиды низкой плотности, ммоль/л	5,02 ± 0,016	3,89 ± 0,018
Липопротеиды высокой плотности, ммоль/л	1,06 ± 0,002	1,34 ± 0,004
Липопротеиды очень низкой плотности, ммоль/л	0,84 ± 0,002	0,66 ± 0,002
Триглицериды, ммоль/л	1,84 ± 0,005	1,46 ± 0,003
Индекс атерогенности	5,52 ± 0,029	3,39 ± 0,024

Таблица 3

Цитокиновый профиль исследуемых групп по данным иммуноферментного анализа

Показатели, пг/мл	Больные тофусной подагрой (n = 20)	Пациенты с бессимптомной гиперурикемией (n = 14)	p
IL-1β	2,92 ± 0,81	2,21 ± 0,45	0,0154
TNF-α	3,34 ± 2,84	2,92 ± 1,10	0,0972
IL-2	4,73 ± 1,77	3,45 ± 0,89	0,0861
IL-4	1,38 ± 0,53	1,36 ± 0,40	0,0028
IL-6	4,92 ± 2,26	3,75 ± 0,53	0,0142
IL-8	38,08 ± 9,82	17,18 ± 5,61	0,0002
IL-10	11,21 ± 2,18	6,45 ± 0,61	0,0078
IL-20	7,50 ± 4,61	4,37 ± 0,75	0,087

Среди 486 потенциальных биомаркерных белков, ответственных за адгезию и миграцию клеток воспаления и участвующих в развитии иммунного ответа, по результатам автоматизированного сличения белковых молекул с базой TagIdent, наибольшая экспрессия отмечалась у калгранулина A S100A8 — миелоид-ассоциированного белка-8 (MRP-8) (10,8 кДа), и калгранулина B S100A9 — миелоид-ассоциированного белка-14 (MRP-14) (13,2 кДа), образующих единый гетеродимер (24,0 кДа), также известный как калпротектин (рис. 1).

Помимо гетеродимерного белка MRP8/MRP14, повышение IL-8 также коррелировало с хроматографическими пиками белков из диапазона 12692-12698 Да — катепсин В, хромогранин А (CMGA), фибронектин тип 3 (FNDC5), калликреин-пептидаза 8 (KLK8), амилоид А4 (SAA4), трансформирующий фактор роста β (TGFβ), однако величина их экспрессии была минимум в 22 раза ниже вышеуказанного гетеродимера MRP8/MRP14. Белковый гетеродимерный комплекс MRP8/MRP14 показал четкую положительную связь с титром циркулирующего IL-8 (p = 0,009) (рис. 2), при этом длительность заболевания подагрой и наличие тофусов положительно коррелировали с соотношением IL-8 к MRP8/MRP14 (p = 0,041). В обеих исследуемых группах уровень мочевой кислоты показал слабую корреляционную связь с высоким титром MRP8/MRP14 или IL-8 (p = 0,084), что соотносится с различной выраженностью клинических проявлений подагры и коморбидной патологии при вариабельном уровне мочевой кислоты в сыворотке крови (рис. 3).

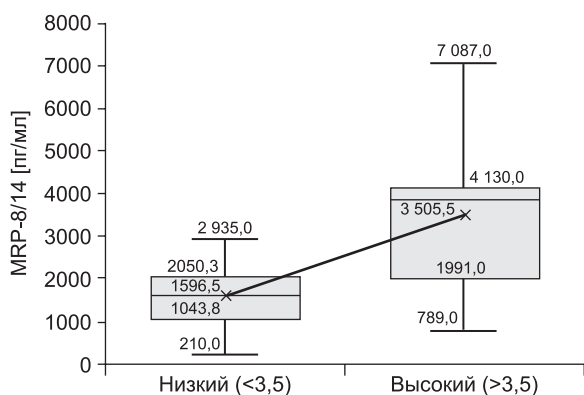


Рис. 1. Соответствие масс-спектрометрических пиков белкам MRP8, MRP14 и MRP8/14 после профилирования кандидатных маркеров по системе TagIdent.

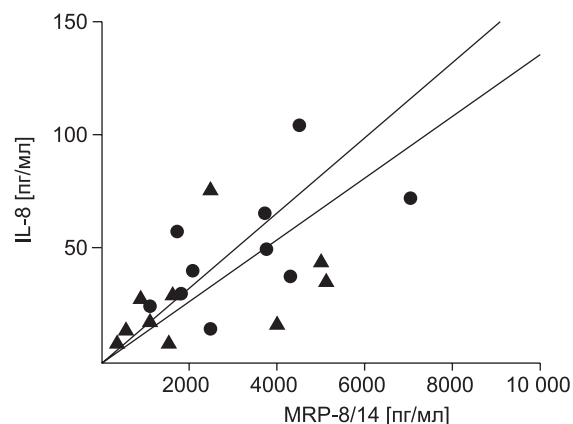


Рис. 2. Повышение уровня MRP8/14 коррелирует с титром IL-8 у больных тофусной подагрой (круги) и у обследуемых с бессимптомной гиперурикемией (треугольники).

Тем не менее, по приведенным результатам, обследуемые с высокими показателями белков MRP8/MRP14 имели больший удельный индекс атерогенности (p = 0,0012) (рис. 4), что отражает более выраженные отклонения липидного профиля.

Проведенные исследования путем анализа группы провоспалительных цитокинов и циркулирующего протеома в сыворотке крови показали наличие таргетных биомаркеров у больных подагрическим артритом. Высокий уровень IL-8 (также описанный в литературе как CXCL8, хемокин подсемейства CXC) [14] — одного из основных провоспалительных хемотаксических цитокинов, продуцируемых макрофагами и активированными эндотелиальными клетками. По последним данным, IL-8 накапливается не только в эндотелии атеросклеротически измененных сосудов, но и в самих атеросклеротических бляшках [15], что делает его независимым предиктором кардиоваскулярной патологии и метаболических сдвигов как у больных подагрой, так и у людей с бессимптомной гиперурикемией. Выявленный масс-спектрометрическим методом димерный белковый комплекс MRP8/MRP14 является агонистом толл-подобных рецепторов 4 (TLR4), активация которого также запускает внутриклеточный сигнальный путь NF-κB и продукцию провоспалительных цитокинов [10], и наряду с кардиоваскулярными поражениями ассоциируется с развитием нарушения толерантности к глюкозе, метаболическим синдромом, НЖБП и сахарным диабетом 2-го типа [5, 15]. По

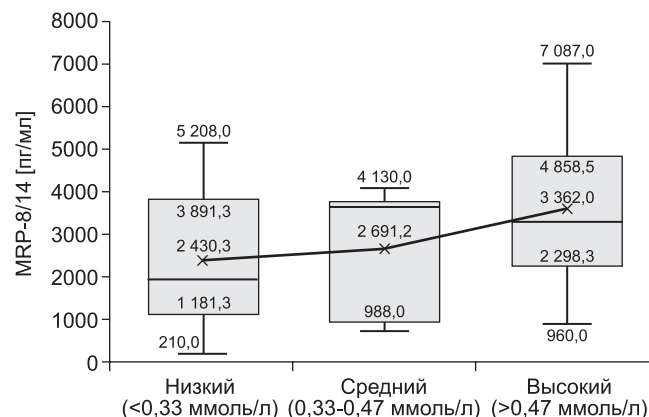


Рис. 3. Распределение больных тофусной подагрой и обследуемых с бессимптомной гиперурикемией по терцилям содержания мочевой кислоты в сыворотке крови, MRP8/14 имеет слабую корреляцию с уровнем мочевой кислоты.

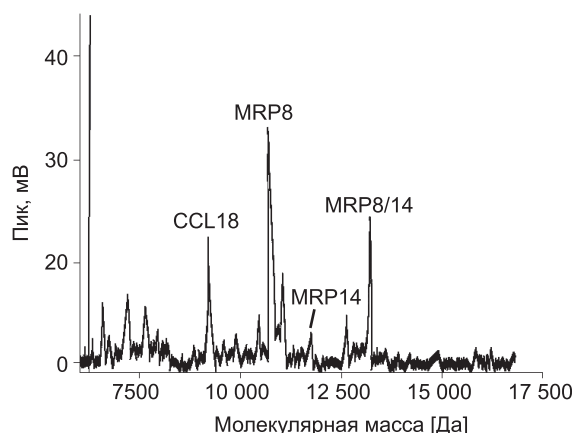


Рис. 4. Распределение больных тофусной подагрой и обследуемых с бессимптомной гиперурикемией по медиане индекса атерогенности, MRP8/14 имеет положительную корреляцию с повышенным индексом атерогенности ((ОХС-ЛПВП)/ЛПВП).

данным различных авторов, наряду с IL-8, у пациентов с метаболическими сдвигами также наблюдается экспрессия таких медиаторов, как IL-32, CXCL-7, тромбопоэтин, апелин и др., и вместе с тем снижение титра вазопротективных медиаторов, таких как онкостатин М, хромогранин А, вазостатин и др. [16] Однако более полная расшифровка протеома и расширенный поиск кандидатных биомаркеров ограничиваются малой репрезентативной выборкой, существенной длительностью исследования (на анализ одного образца требуется около 1,5 ч и в среднем 60 дней на все исследование) и чувствительностью газовой-жидкостной масс-спектрометрии [7]. В определенной степени эти недостатки могут быть нивелированы двухэтапным протеомным подходом, при котором за профилированием и функциональной категоризацией белков следует мониторинг множественных реакций (MRM масс-спектрометрия) для ускоренного определения белковых фракций в анализе без необходимости проведения иммунологического профилирования [17]. Однако данный метод отличается затратностью и в ряде исследований продемонстрировал значительные расхождения с иммуносорбентными методиками исследования.

Кроме того, белковый комплекс MRP8/MRP14 (калгранулин А/В) наряду с сывороточным белком А, виментином, коактозин-подобным белком-1 и др. не является высокоспецифичным для гиперурикемии и подагрического артрита с тофусами. Имеются данные о повышении титра калгранулина А, В и С у больных ревматоидным артритом (преимущественно эрозивным), системным склерозом (склеродермией) [18].

Заключение. Полученные данные позволили выявить специфические протеомные маркеры у больных подагрой — циркулирующего интерлейкина-8 (IL-8)/CXCL8 и ассоциированного гетеродимерного белкового комплекса MRP8/MRP14, коррелирующих со сдвигами метаболических показателей: ХС, ЛПНП, ЛПВП, ЛПОНП, ТГ, мочевой кислоты — как у больных тофусной подагрой, так и у людей с бессимптомной гиперурикемией, которые являются независимыми предикторами развития в данной популяции сердечно-сосудистой патологии, НЖБП и метаболического синдрома. Дальнейшее развитие и применение протеомных технологий позволит проводить системный анализ молекулярных механизмов подагры, а также сопутствующих ей коморбидных состояний.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3—6, 9—12, 14—18
см. REFERENCES)

- Барскова В.Г., Ильиных Е.В., Елисеев М.С. Кардиоваскулярный риск у больных подагрой. *Ожирение и метаболизм*. 2006; 3(8): 40—3.
- Новиков А.А., Александрова Е.Н., Насонов Е.Л. Протеомные исследования в ревматологии. *Научно-практическая ревматология*. 2012; 6(50): 56—62.
- Елисеев М.С., Барскова В.Г., Насонов Е.Л. Канакиnumаб (ингибитор интерлейкина 1 β — прорыв в возможностях противовоспалительной терапии при подагре. *Научно-практическая ревматология*. 2013; 51(4): 428—31.
- Ватутин Н.Т., Смирнова А.С., Гриценко Ю.П. Диагностика, лечение и профилактика подагры: международные клинические рекомендации 2014 г. *Современная ревматология*. 2015; 9(3): 70—2.

REFERENCES

- Martino F., Glimcher L.H. Gout: new insights into an old disease. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(8): 2073—5.
- Barskova V.G., Ilinykh E.V., Eliseev M.S. et al. Cardiovascular risk in patients with gout. *Ozhirenie i metabolism.* 2006; 3(8): 40—3. (in Russian)
- Kuo C.F., See L.C., Luo S.F., Ko Y.S., Lin Y.S., Hwang J.S. et al. Gout: an independent risk factor for all-cause and cardiovascular mortality. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49: 141—6.
- Kanbay M., Jensen T., Solak Y., Le M., Roncal-Jimenez C., Rivard C. et al. Uric acid in metabolic syndrome: from an innocent bystander to a central player. *Eur. J. Intern. Med.* 2016; 29: 3—8.
- Bass M., Merriman R. Fatty acid metabolism and lipotoxicity in the pathogenesis of NAFLD/NASH. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 21: 109—22.
- Piret S.E., Danoy P., Dahan K. et al. Genome-wide study of familial juvenile hyperuricaemic (gouty) nephropathy (FJHN) indicates a new locus, FJHN3, linked to chromosome 2p22.1—p21. *Hum. Genet.* 2011; 129: 51—8.
- Novikov A.A., Aleksandrova E.N., Nasonov E.L. Proteomic studies in rheumatology. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2012; 6(50): 56—62. (in Russian)
- Eliseev M.S., Barskova V.G., Nasonov E.L. Kanakinumab (inhibitor of interleukin 1 β — a breakthrough in the possibilities of anti-inflammatory therapy for gout. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2013; 51(4): 428—31. (in Russian)
- Vogl T., Tenbrock K., Ludwig S., Leukert N., Ehrhardt C., van Zoelen M.A. et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* 2007; 13: 1042—9.
- Kim S.J., Chae S., Kim H., Mun D.G., Back S., Choi H.Y., Park K.S., Hwang D., Choi S.H., Lee S.W. A protein profile of visceral adipose tissues linked to early pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mol. Cell. Proteomics*. 2014; 13: 811—22.
- Schauer C., Janko C., Munoz L., Zhao Y., Kienhofer D., Frey B. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* 2014; 20: 511—7.
- Chang X., Cui Y., Zong M. et al. Identification of proteins with increased expression in rheumatoid arthritis synovial tissues. *J. Rheumatol.* 2009; 36: 872—80.
- Vatutin N.T., Smirnova A.S., Gritsenko Yu.P. Diagnosis, treatment and prevention of gout: international clinical guidelines — 2014. *Sovremennaya revmatologiya*. 2015; 9(3): 70—2. (in Russian)
- Inoue T., Komoda H., Nonaka M., Kameda M., Uchida T., Node K. Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Int. J. Cardiol.* 2008; 124: 319—25.
- Shih M.H., Lazo M., Liu S.H., Bonekamp S., Hernaez R., Clark J.M. Association between serum uric acid and nonalcoholic fatty liver disease in the US population. *J. Formos. Med. Assoc.* 2015; 114: 314—20.
- Baumann M., Schmaderer C., Burkhardt K., Haller B., Heemann U., Dugi K. et al. MRP8/14 is associated with systemic inflammation in stable coronary atherosclerosis in men. *Eur. J. Clin. Invest.* 2011; 41: 1261—7.
- Boja E.S., Rodriguez H. Mass spectrometry-based targeted quantitative proteomics: achieving sensitive and reproducible detection of proteins. *Proteomics*. 2012; 12: 1093—1110.
- Van Bon L., Cossu M., Lof A., Gohar F., van den Berg W., van Heerde W. et al. Proteomic analysis of plasma identifies the Toll-like receptor agonists S100A8/A9 as a novel possible marker for systemic sclerosis phenotype. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73: 1585—9.

Поступила 30.03.17
Принята к печати 15.04.17

ЦИТОЛОГИЯ

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616-006.441-091.8-076.5-078.33

Славнова Е.Н.¹, Тюрина Н.Г.¹, Головин С.Т.², Петров А.Н.¹

КОМПЛЕКСНАЯ МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИМФОМЫ МАРГИНАЛЬНОЙ ЗОНЫ

¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «Национальный медицинский радиологический исследовательский центр» Минздрава РФ, 125284, Москва, Российская Федерация;
²Клинический госпиталь ФКУЗ «МСЧ МВД России по г. Москве», 127299, Москва, Российская Федерация

Цель исследования: определить возможности комплексной морфологической диагностики [рутинной цитологии и гистологии, иммуноцитохимии (ИЦХ) и иммуногистохимии (ИГХ), молекулярной генетики] лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ). В исследование включены 10 больных с установленным на основании применения морфологического (цитологического и гистологического), иммуноморфологического (ИЦХ и ИГХ) и молекулярно-генетического методов исследования диагноза лимфомы из клеток маргинальной зоны. Для иммунофенотипирования применяли ИЦХ-метод (EnVision FLEX) с использованием моноклональных антител фирмы DAKO. Для иммунофенотипирования методом проточной цитофлюориметрии (проточный цитофлюориметр FACS Calibur фирмы Becton Dickinson, США) применяли антитела фирмы DAKO, меченные флюоресцентными метками (FITC или RPE). Панель антител включала: общий лейкоцитарный антиген, общие цитоцератины, CD19, CD20, CD79a, CD10, Bcl2, Bcl6, CD23, CD34, TdT, CD3, CD4, CD5, CD8, CyclinD1, Ki67, κ, λ. Использовали FISH-метод с зондами Bcl2 FISH DNA Probe, Split Signal и MALT1 FISH DNA Probe Split Signal фирмы DAKO. Для дифференциальной диагностики с фолликулярной лимфомой у одного больного определяли перестройку гена Bcl2. Для диагностики ЛМЗ трех больных с помощью FISH-метода определяли транслокацию t(11;18)(q21;q21), вовлекающую ген ингибитора апоптоза API2 и ген MALT1. Рутинное цитологическое исследование десяти случаев позволило установить точный диагноз лимфомы лишь в пяти из них, без указания, что это ЛМЗ. В двух случаях при рутинном цитологическом исследовании высказано лишь подозрение на лимфому. У всех 10 больных наблюдали положительную экспрессию пан-В-клеточных маркеров CD19, CD20, CD79a, как при ИГХ, так и при ИЦХ и проточной цитофлюориметрии. У 6 (60%) больных наблюдали положительную экспрессию гена Bcl2 как при ИГХ, так и при ИЦХ и проточной цитофлюориметрии. При сравнении ИГХ, проточной цитофлюориметрии и ИЦХ выявлено отсутствие экспрессии CD5, CD3, CD10, CD34, CD23, Bcl6, TdT, циклина D1. При ИГХ и ИЦХ в 10 случаях белок пролиферативной активности Ki-67 составлял не более 30%. При проточной цитофлюориметрии определяли клональность по легким цепям иммуноглобулинов κ или λ (Igλ/Igκ). В целом коэффициент корреляции (r; p < 0,05) между данными ИГХ и ИЦХ, проточной цитофлюориметрии составил 1. 4 больным для уточнения диагноза проведена FISH-реакция. Перестройка гена Bcl2 у больного с нодальной ЛМЗ не обнаружена. У 3 больных с MALT-лимфомами обнаружена перестройка гена MALT1. Таким образом, точность рутинного цитологического исследования при установлении диагноза лимфомы без указания на ее тип при ЛМЗ составила 50%, чувствительность — 50%, специфичность — 100%. Точность иммунофенотипирования, позволяющая установить ЛМЗ, составила 100%, чувствительность — 100%, специфичность — 100%. Коэффициент корреляции (r; p < 0,05) между данными ИГХ и ИЦХ, проточной цитофлюориметрии составил 1. Точность, чувствительность и специфичность комплексного исследования (цитологии, ИЦХ и FISH-метода) в диагностике ЛМЗ составили 100%.

Ключевые слова: лимфома маргинальной зоны; цитология; иммуноцитохимия; проточная цитофлюориметрия; FISH-метод.

Для цитирования: Славнова Е.Н., Тюрина Н.Г., Головин С.Т., Петров А.Н. Комплексная морфологическая диагностика лимфомы маргинальной зоны. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (8): 490-497. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-490-497>

Slavnova E.N.¹, Tyurina N.G.¹, Golovin S.T.², Petrov A.N.¹

THE COMPLEX MORPHOLOGIC DIAGNOSTIC OF MARGINAL ZONE LYMPHOMA

¹The P.A. Hertsen Moscow research oncologic institute, the branch of the National medical radiologic research center of Minzdrav of Russia, 125284 Moscow, Russia

²The clinical hospital "The Moscow medical sanitary unit of the Interior Ministry", 127299 Moscow, Russia

The purpose of study: To determine possibilities of complex morphological diagnostic (routine cytology and histology, immunocytochemistry and immunohistochemistry, molecular genetics) of lymphoma of marginal zone. The study included 10 patients with diagnosis of lymphoma of marginal zone cells, established on the basis of application of morphological (cytological and histological), immunomorphologic (immunocytochemical and immunohistochemical) and molecular genetic techniques. The immunofenotyping was implemented using immunocytochemical technique (EnVision FLEX) applying monoclonal antibodies by DAKO manufacturer. The immunofenotyping was implemented by flow cytofluorometry technique (flow cytofluorometer FACS Calibur by Becton Dickinson, USA) using antibodies by DAKO manufacturer labeled by fluorescent marks (FITC or RPE). The antibody panel

Для корреспонденции: Славнова Елена Николаевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр.отд-ния онкоцитологии Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена, филиала ФГБУ «Национальный медицинский радиологический исследовательский центр», 125284, Москва, e-mail: slavnov@rambler.ru

included: common leukocytic antigen, common cytokeratins CD19, CD20, CD79a, CD10, Bcl2, Bcl6, CD23, CD34, TdT, CD3, CD4, CD5, CD8, CyclinD1, Ki67, κ , λ . The FISH technique was applied using probes Bcl2 FISH DNA Probe, Split Signal u MALT1 FISH DNA Probe Split Signal by DAKO manufacturer. In one patient a gene Bcl2 change was detected with purpose of differentiating diagnostic with follicular lymphoma. In three patients, diagnosing lymphoma of marginal zone was implemented by FISH technique using detection of translocation (11;18)(q21;q21), involving gene of inhibitor of apoptosis API2 and gene MALT1. The routine cytological analysis of ten cases permitted to establish an exact diagnosis of lymphoma only in five cases and with no indication that it is lymphoma of marginal zone. In two cases under routine cytological analysis only a suspicion about lymphoma was suggested. In all ten patients a positive expression of pan-B-cellular markers CD19, CD20, CD79a was observed both under immunocytochemistry and immunohistochemistry and flow cytometry. In 6 patients (60%) a positive expression of gene Bcl2 was observed both under immunocytochemistry and immunohistochemistry and flow cytometry. The comparison of immunocytochemistry and immunohistochemistry and flow cytometry established absence of expression of CD5, CD3, CD10, CD34, CD23, Bcl6, TdT, cyclin D1. Under immunocytochemistry and immunohistochemistry in ten cases proliferative activity protein Ki-67 made up no more than 30%. Under flow cytometry clonality on light chains of immunoglobulins κ or λ (Ig λ /Ig κ) were established. Overall, correlation coefficient (r , $p < 0,05$) between immunocytochemistry and immunohistochemistry, flow cytometry made up to 1. The four patients were applied FISH-reaction for adjustment of diagnosis. In patient with nodal lymphoma of marginal zone gene Bcl2 change was absent. In three patients with MALT-lymphoma a gene MALT1 change was established. Thereby, accuracy of routine cytological analysis at diagnosing lymphoma without indication of its type in case of lymphoma of marginal zone made up to 50%, sensitivity - 50%, specificity - 100%. The accuracy of immunofenotyping permitting diagnosing lymphoma of marginal zone made up to 100%, sensitivity - 100%, specificity - 100%. The correlation coefficient (r ; $p < 0,05$) between data of immunocytochemistry and immunohistochemistry, flow cytometry made up to 1. The accuracy, sensitivity and specificity of complex analysis (cytology, immunocytochemistry and FISH-technique) in diagnostic of lymphoma of marginal zone made up to 100%.

Key words: lymphoma of marginal zone; cytology; immunocytochemistry; flow cytometry; FISH-technique

For citation: Slavnova E.N., Tyurina N.G., Golovin S.T., Petrov A.N. The complex morphologic diagnostic of marginal zone lymphoma. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (8): 490-497. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-490-497>*

For correspondence: Slavnova E.N., candidate of medical sciences, senior researcher of the department of oncocytopathology. e-mail: slavnov@rambler.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 30.03.2017
Accepted 15.04.2017

Введение. Лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ) относят к индолентным лимфомам. Впервые о них упоминают Albert и Sheibani в 1984—1986 гг. как о моноцитотидной В-клеточной лимфоме [1]. Термин «лимфома маргинальной зоны» введен позже в REAL классификации в 1994 г. [2]. Субстрат ЛМЗ — опухолевые клетки, аналогичные нормальным клеткам маргинальной зоны лимфоидной ткани селезенки, слизистых оболочек (MALT) и лимфатических узлов. ЛМЗ составляют 11% всех лимфоидных опухолей и чаще возникают в возрасте старше 50 лет. В классификации ВОЗ (2008) опухолей гемопоэтической и лимфоидной ткани выделяют три вида ЛМЗ: лимфому маргинальной зоны селезенки, нодальную и экстранодальную лимфому маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированную со слизистыми оболочками (MALT-лимфома) [3].

Селезеночная лимфома маргинальной зоны (СЛМЗ) — редкая В-клеточная опухоль. СЛМЗ составляет 1% всех лимфом и может быть причиной неверной диагностики неклассифицируемых хронических лимфоидных лейкозов, которые CD5-негативны [4]. Большинство пациентов старше 50 лет, соотношение мужчин и женщин одинаковое [5].

Опухоль поражает селезенку и лимфатические узлы ворот селезенки, костный мозг и периферическую кровь. Может быть вовлечена печень. Периферические лимфатические узлы обычно не вовлечены. У больных наблюдают спленомегалию, иногда сопровождающуюся аутоиммунной тромбоцитопенией или анемией и переменным присутствием ворсинчатых лимфоцитов в периферической крови. У одной трети пациентов возможно наличие небольшого количества моноклонального белка (парапротеин IgM) в сыворотке крови, однако не отмечают гипервязкость и гипергаммаглобулинемию [6]. В Южной Европе описана ассоциация СЛМЗ с вирусом гепатита С.

Морфологически очаговые опухолевые инфильтраты располагаются вокруг белой селезеночной пульпы или (чаще) заменяют реактивные зародышевые центры со сглаживанием картины нормального фолликула [7]. Опухолевые лимфоциты представлены клетками малого и среднего размера с дис-

персной структурой глыбчатого хроматина, характерными светлыми бороздами и обильной бледной слабо базофильной цитоплазмой, напоминающими клетки маргинальной зоны, которые перемежаются с редкими трансформированными бластами. В начальных стадиях заболевания структура селезенки сохранена. По мере прогрессирования заболевания наблюдают последовательное диффузное поражение белой, а затем и красной пульпы за счет инфильтрации опухолевыми клетками маргинальной зоны, а также вовлечение в патологический процесс синусов [8].

В редких случаях в центрах белых узелков пульпы могут присутствовать клетки с плазматической дифференцировкой, скопления плазматических клеток. Опухолевые лимфоидные клетки могут определяться в периферической крови и иногда характеризуются наличием ворсинок. [9]. Дифференциальную диагностику необходимо проводить с лимфомой из малых лимфоцитов/хроническим В-клеточным лимфолейкозом, волосатоклеточным лейкозом, лимфомой клеток мантии, фолликулярной лимфомой и лимфоплазматической лимфомой. Для дифференциальной диагностики СЛМЗ помимо морфологического исследования необходимо иммунофенотипирование.

Имунофенотип опухолевых клеток следующий: положительная экспрессия поверхностных IgM+, IgD+/-, CD20+, CD79a+, отрицательная экспрессия CD5-, CD10-, CD23-, CD43- и аннексина А1- [10]. Экспрессия CD103 и циклина D1 отсутствует. Проллиферативная активность Ki67 низкая. Отсутствие экспрессии циклина D1 и CD5 позволяет исключить лимфому из клеток мантии и хронический лимфолейкоз соответственно. Отсутствие аннексина А1 исключает волосатоклеточный лейкоз, а отрицательная экспрессия CD10 и BCL6 позволяет исключить фолликулярную лимфому.

В большинстве СЛМЗ определяют перестройку генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, в 50% случаев — соматические мутации V μ -гена. Цитогенетически выявляют нарушения в области длинного плеча 7 хромосомы. Делеция 7q31-32 и транслокация этого региона в область капша-цепи хромосомы

2 описаны в 40% случаев СЛМЗ [11]. В ряде случаев СЛМЗ определяет дисрегуляцию гена *CDK6* (циклинзависимая киназа 6), расположенного в локусе 7q21. Достаточно часто (36%) описаны полная или частичная трисомия хромосомы 3 и ряд других цитогенетических аномалий. СЛМЗ не имеет транслокацию t(11; 18), характерную для MALT-лимфом, t(14; 18) (перестройка гена *BCL2*), характерную для фолликулярной лимфомы, t(11; 14) (перестройка гена *CCND1*), характерную для лимфомы зоны мантии. СЛМЗ имеет специфический транскрипционный профиль по сравнению с другими мелкоклеточными лимфомами. Однако в диагностике СЛМЗ имеются определенные трудности. Выделяют редкие случаи с атипичной морфологией либо атипичным иммунофенотипом. Эти молекулярные изменения включают гены, участвующие в сигнальных каскадах АКТ1 и В-клеточного рецептора. Нередко определяют трисомии хромосом 12 и 18, делеции 13q14 и 7q.

В большинстве случаев прогноз благоприятный даже при поражении костного мозга. Может произойти трансформация в диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому. Встречают случаи, ассоциированные с гепатитом С (НСV-положительные). К неблагоприятным клиническим прогностическим факторам относят большую массу опухоли, тяжелое общее состояние больного. Случаи с мутантным TP53, присутствие 7q делеции и немутированных *IGHV* (вариабельных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов) генов связаны с неблагоприятным исходом.

Экстранодальная В-клеточная ЛМЗ, связанная с лимфоидной тканью слизистых оболочек (MALT-лимфома), впервые описана P. Isaacson и D. Wright в 1983 г. и представляет собой экстранодальную В-клеточную лимфому [12]. MALT-лимфома составляет 8% всех В-клеточных лимфом [3] и до 50% первичных лимфом желудка [13]. В большинстве случаев опухоль встречается у взрослых (средний возраст — 61 год), чаще у женщин (соотношение мужчин и женщин — 1:1,2) [3]. Более высокую частоту MALT-лимфом желудка наблюдают на северо-востоке Италии [13]. Отдельный тип, ранее известный как болезнь альфа-тяжелых цепей, который теперь называют иммунопролиферативным заболеванием тонкого кишечника (IPSID), встречаются на Ближнем Востоке, в некоторых регионах Южной Африки и многих других тропических и субтропических районах [14].

T. Hussell и соавт. [15] показали, что MALT-лимфомы желудка связаны с инфицированием *Helicobacter pylori* и зависят от наличия Т-клеток, специфически активированных антигенами *Helicobacter pylori*. Важность этой стимуляции в естественных условиях была четко продемонстрирована возможностью развития ремиссии у больных желудочной MALT-лимфомой при антибактериальной терапии *Helicobacter pylori* [15]. Антигенная стимуляция *Chlamydia psittaci*, *Campylobacter jejuni* и *Borrelia burgdorferi* имеет значение для некоторых случаев MALT-лимфом придатков глаза, тонкого кишечника (IPSID) и кожи соответственно [16, 17, 18]. Во многих случаях MALT-лимфом у больных в анамнезе имелся хронический воспалительный процесс, который приводил к накоплению экстранодальной лимфоидной ткани [19]. Хроническое воспаление может быть результатом инфекции, аутоиммунного заболевания или другого неизвестного стимула. Инфекционные агенты, которые могут вызвать накопление лимфоидной ткани, предшествующей MALT-лимфоме, включают *Helicobacter pylori* (желудочная MALT-лимфома) [15], *Chlamydia psittaci* (MALT-лимфома придатков глаза) [17], *Campylobacter jejuni* (IPSID тонкой кишки) [18] и *Borrelia burgdorferi* (кожная MALT-лимфома) [16]. Аутоиммунные заболевания, такие как синдром Шегрена и тиреоидит Хашимото, сопровождающиеся хроническим воспалением, предшествуют MALT-лимфомам слюнных желез и щитовидной железы. Синдром Шегрена/лимфоэпителиальный сиаладенит имеет 44-кратное увеличение риска развития лимфомы [20]. 85% лимфом у больных с синдромом Шегрена/лимфоэпителиальным сиала-

денитом составляют MALT-лимфомы. У больных с тиреоидитом Хашимото в 3 раза выше риск развития лимфомы [21]. Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) — наиболее частое место локализации MALT-лимфом (50% всех случаев) [22]. Поражение тонкого кишечника, как правило, отмечают у пациентов с IPSID. MALT-лимфомы обнаруживают в слюнных железах (14%), легких (14%), орбите (12%), коже (11%), щитовидной железе (4%) и молочной железе (4%) [23].

У большинства пациентов заболевание диагностируют в I или II стадии. Меньшая часть пациентов (2—20%) имеет поражение костного мозга и поражение костей [24]. Поражение костного мозга редко отмечают при поражении желудка и более часто при MALT-лимфомах легких и придатков глаза. Мультифокальные очаги поражения при MALT-лимфоме наблюдают у 10% больных, чаще при опухолях ЖКТ, слюнных желез, кожи. Характерный признак во многих случаях — плазматическая дифференцировка; кроме того, у трети пациентов с MALT-лимфомой в сыворотке крови обнаруживают парапротеин (М-компонент) [25]. Исключение составляет иммунопролиферативная болезнь тонкого кишечника (IPSID), при которой в периферической крови обычно можно обнаружить aberrантные альфа-тяжелые цепи.

MALT-лимфома состоит из морфологически гетерогенных малых В-лимфоцитов маргинальной зоны (центроцитоподобного типа), моноцитоподобных клеток, малых лимфоцитов и единичных иммунобластов и центробластов. При MALT-лимфоме инфильтраты из опухолевых клеток обнаруживают в маргинальной зоне вокруг реактивно измененных В-клеточных фолликулов с сохраненной мантией. Плазматическую дифференцировку обнаруживают в опухолевых клетках, подвергшихся антигенной стимуляции, она присутствует примерно в одной трети MALT-лимфом желудка, часто в кожных MALT-лимфомах и служит постоянным признаком тиреоидных MALT-лимфом. Гистологическая особенность иммунопролиферативной болезни тонкого кишечника (IPSID) — плазматическая дифференцировка опухолевых клеток [26]. Иногда в небольшом количестве определяют большие клетки, напоминающие центробласты или иммунобласты. Опухолевые клетки маргинальной зоны инфильтрируют железистую ткань. При этом происходит разрушение эпителия, формируются так называемые лимфоэпителиальные поражения, что служит определяющим признаком MALT-лимфом. Лимфоэпителиальные поражения представляют собой агрегаты из трех или более опухолевых клеток маргинальной зоны с дистрофией и последующим разрушением эпителия. Опухолевый инфильтрат находится в краевой зоне реактивных В-клеточных фолликулов и распространяется в интерфолликулярную область. Опухолевые клетки иногда специфически колонизируют зародышевые центры реактивных фолликулов. Возникающие при этом изменения напоминают фолликулярную лимфому.

Дифференциальную диагностику MALT-лимфом проводят с реактивными воспалительными процессами, которые обычно предшествуют развитию лимфомы, например гастрит, вызванный *Helicobacter pylori*, лимфоэпителиальный сиаладенит, тиреоидит Хашимото и другие лимфомы из мелких В-клеток (фолликулярная лимфома, лимфома из клеток мантии, лимфобластная лимфома). Отличие от реактивных процессов состоит в наличии деструктивных инфильтратов из экстрафолликулярных В-клеток, как правило, с морфологией клеток маргинальной зоны. В сложных случаях необходимо прибегать к иммунофенотипированию или молекулярно-генетическому анализу для оценки клональности В-клеток, чтобы установить или исключить диагноз MALT-лимфомы. Однако молекулярные исследования могут также продемонстрировать клональность В-клеток в некоторых неопухолевых разрастаниях. Отличие от других малых В-клеточных лимфом состоит в сочетании характерных морфологических и иммунофенотипических особенностей.

Иммунофенотип опухолевых клеток следующий: выявляют экспрессию IgM (при отсутствии IgD), реже — IgA или IgG. Опухолевые клетки MALT-лимфомы являются CD20+, CD79a+, CD5-, CD10-, CD23-, CD43+/-, CD11c+/- (слабая). В колонизированных клетками лимфомы фолликулах определяют сеть фолликулярных дендритных клеток, имеющих положительную экспрессию при иммуноморфологическом исследовании с CD21 и CD35. Специфические антигенные маркеры MALT-лимфом отсутствуют. В большинстве клеток определяют один тип легких цепей — κ или λ , что имеет важное значение в дифференциальной диагностике с доброкачественными лимфоидными инфильтратами. При дифференциальной диагностике с другими В-клеточными мелкоклеточными лимфомами характерно отсутствие CD5 (в отличие от большинства клеток мантии и малых лимфоцитов), циклина D1 (в отличие от клеток мантийной лимфомы) и CD10 (в отличие от фолликулярных лимфом). Диагноз IPSID ставят на основании наличия укороченных свободных тяжелых альфа-цепей и отсутствия легких альфа-цепей в биологических жидкостях (сыворотка крови, моча, выделения тощей кишки и другие жидкости). При IPSID опухолевые клетки (как маргинальной зоны, так и плазматические) экспрессируют тяжелые альфа-цепи (без легких цепей).

Цитогенетические и молекулярно-генетические аномалии при MALT-лимфомах достаточно разнообразны. MALT-лимфомы характеризуются перестройкой генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. В опухолевых клетках наблюдают соматические гипермутации генов вариабельных участков иммуноглобулинов, что указывает на их происхождение из В-клеток памяти из постзародышевых центров. К транслокациям, связанным с MALT-лимфомами, относят t(11; 18) (q21; q21), t(1; 14) (p22; q32), t(14; 18) (q32; q21) и t(3; 14) (p14.1; q32), что приводит к образованию химерного белка (API2-MALT1) или нарушению регуляции транскрипции (BCL10, MALT1, FOXP1) соответственно. Трисомии хромосом 3, 18 или реже других хромосом — редкий и неспецифический признак при MALT-лимфомах. Частота обнаружения транслокаций или трисомий заметно различается в зависимости от первичной локализации заболевания. Транслокацию t(11; 18) (q21; q21) чаще всего обнаруживают в MALT-лимфомах легких и желудка, t(14; 18) (q32; q21) — в MALT-лимфомах придатков глаза/орбиты и слюнных желез, t(3; 14) (p14.1; q32) — в MALT-лимфомах щитовидной железы, придатков глаза/орбиты и кожи. Отмечена географическая изменчивость заболеваемости и локализации MALT-лимфом, что предполагает различные воздействия окружающей среды, таких как инфекционные или другие этиологические факторы.

MALT-лимфомы характеризуются вялым течением и медленной диссеминацией. Рецидивы могут произойти после многих лет, включают различные экстранодальные локализации; их чаще встречают у пациентов с MALT-лимфомами вне желудка [24]. Распространение процесса на другие экстранодальные локализации и костный мозг не приводит к ухудшению течения заболевания. Длительные ремиссии бывают при MALT-лимфомах желудка, ассоциированных с *Helicobacter pylori* при предварительном проведении антибактериальной терапии. Исключение составляют случаи с t(11; 18) (q21; q21), резистентные к эрадикационной терапии *Helicobacter pylori*. При IPSID ремиссии наступали после терапии антибиотиками широкого спектра действия. Антибиотики также были успешно использованы для лечения других MALT-лимфом. Переход в диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому отмечают в редких случаях.

Лимфома маргинальной зоны лимфатического узла (ЛМЗЛУ) — первичная В-клеточная лимфома, морфологически сходна с ЛМЗ экстранодального и селезеночного типов, но без признаков экстранодального или селезеночного поражения. ЛМЗЛУ — редкое заболевание, которое составляет

2% всех лимфоидных новообразований [27]. В большинстве случаев ее встречают у взрослых (средний возраст — около 60 лет) в одинаковом соотношении у мужчин и женщин [28]. Такая лимфома может возникнуть у детей. У 20—24% пациентов обнаруживают вирус гепатита С [28]. Локализация поражения — периферические лимфатические узлы, иногда наблюдают поражение костного мозга и периферической крови [27].

Клинические особенности заключаются в том, что большинство пациентов имеют бессимптомное течение как при локализованной, так и генерализованной периферической лимфаденопатии [27, 28]. Необходимо исключить наличие первичной экстранодальной ЛМЗ.

Морфологически ЛМЗЛУ представлена опухолевыми клетками, малыми лимфоцитами и редкими плазматическими клетками, которые инфильтрируют маргинальную зону реактивных фолликулов и распространяются в межфолликулярные пространства лимфатических узлов. При диффузном поражении в сохранившихся фолликулах можно выявить фолликулярные дендритные клетки и определить маркеры зародышевых центров. Наличие остатков фолликулярных дендритных клеток показывает колонизацию фолликулов, что помогает установлению диагноза ЛМЗЛУ. Опухолевые клетки представлены клетками среднего размера с овальными или вдавленными ядрами с нежной структурой хроматина (центроцитоподобные В-клетки), а также клетками с бобовидным ядром и широким ободком светло-голубой цитоплазмы (моноцитоподобные В-клетки). Варианты с выраженными признаками плазматической дифференцировки необходимо дифференцировать с лимфоплазматической лимфомой. В некоторых случаях имеет место наличие более многочисленных крупных трансформированных клеток (иногда более 20%). Тем не менее, эти клетки, как правило, смешанные, с небольшими клетками и могут быть более распространенными в колонизированных зародышевых центрах.

Иммунофенотип большинства ЛМЗЛУ характеризуется положительной экспрессией пан-В-клеточных маркеров с коэкспрессией CD43 в 50% случаев. Экспрессия CD5, CD23, CD10, BCL6 и циклина D1 отрицательна и BCL2 положительна в большинстве случаев. Экспрессия IgD положительна в большинстве случаев. Опухоли, имитирующие СЛМЗ, имеют сходный фенотип, но, как правило, IgD положительны.

В ЛМЗЛУ наблюдают перестройку генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов и в большинстве случаев соматические мутации VH3- и VH4-генов. Обнаруживают трисомии 3, 18 и 7 хромосом. Не обнаруживают транслокации, связанные с экстранодальными ЛМЗ.

Определен нормальный аналог опухолевых клеток — В-клетка постзародышевого центра маргинальной зоны. Заболевание характеризуется благоприятным течением. 60—80% больных выживают более 5 лет [28]. В редких случаях может происходить трансформация в В-крупноклеточную лимфому.

Педиатрические ЛМЗЛУ имеют отличительные клинические и морфологические характеристики [29]. Их встречают преимущественно у мальчиков (соотношение 20:1). Как правило, они протекают бессимптомно, в локализованной стадии болезни (в 90% — стадия I), в основном с поражением лимфатических узлов головы и шеи. Гистологически опухоль подобна ЛМЗЛУ взрослых, за исключением того, что постепенно трансформируются зародышевые центры, в которых происходят разрушение внешней границы фолликулы и инфильтрация опухолевыми клетками.

Иммунофенотип похож на ЛМЗЛУ взрослых [29]. Дифференциальную диагностику следует проводить с атипичной гиперплазией маргинальной зоны с моноклональной экспрессией Ig, большие клетки могут экспрессировать CD43. В связи с этим необходимо исследование клональных перестроек IGH альфа-цепи для дифференциации педиатрической ЛМЗЛУ от реактивных изменений [29]. Прогноз педиатрической ЛМЗЛУ отличается очень низкой частотой

Сравнительная характеристика различных методик иммунофенотипирования при лимфоме маргинальной зоны

Антитела	ИГХ-метод		Проточная цитофлюориметрия		ИЦХ-метод		Коэффициент корреляции (r), p < 0,05
	Число больных,%	Степень	Число больных,%	Степень	Число больных,%	Степень	
CD19	100	Выраженная	100	Выраженная	100	Выраженная	1
CD20	100	Выраженная	100	Выраженная	100	Выраженная	1
CD79a	100	Выраженная	100	Выраженная	100	Выраженная	1
CD10	0		0		0		1
CD23	0		0		0		1
CD34	0		0		0		1
TdT	0		0		0		1
Igλ/Igκ	Не выполняли		100	Выраженная	Не выполняли		
Bcl2	60	Выраженная	60	Выраженная	60	Выраженная	1
Bcl6	0		0		0		1
CD3	0		0		0		1
CD4	0		0		0		1
CD8	0		0		0		1
CD5	0		0		0		1
Cyclin D1	0		Не выполняли		0		1

рецидивов и долгосрочной выживаемостью после консервативного лечения.

Цель исследования: определить возможности комплексной морфологической диагностики (рутинной цитологии и гистологии, иммуноцитохимии — ИЦХ и иммуногистохимии — ИГХ, молекулярной генетики) ЛМЗ.

Материал и методы. В исследование включены 10 больных с установленным на основании применения морфологического (цитологического и гистологического), иммуноморфологического (ИЦХ и ИГХ) и молекулярно-генетического методов исследования диагноза ЛМЗ.

Исследуемая группа больных была представлена 6 женщинами и 4 мужчинами (соотношение женщин и мужчин — 3:2) в возрасте от 24 до 74 лет (средний возраст — 56 лет) (рис. 1).

У 8 больных наблюдали экстранодальные поражения (MALT-лимфомы) (желудок — 4, околоушные слюнные железы — 2, легкие — 1, орбита — 1), у 2 больных были поражены лимфатические узлы (надключичные лимфатические узлы — 1, шейные — 1). У одного больного с MALT-лимфомой слюнной железы выявлено поражение костного мозга. Цитологический материал представлял: у 2 больных — пунктаты лимфатических узлов (1 — шейный лимфатический узел, у 1 — надключичный лимфатический узел), у 4 — отпечатки с кусочка опухоли желудка, у 2 — пунктаты слюнных желез, у 1 — пунктат орбиты, у 1 — пунктат легкого.

Для иммунофенотипирования применяли ИЦХ-метод (EpVision FLEX) с использованием моноклональных антител фирмы DAKO. Панель антител включала: общий лейкоцитарный антиген, общие цитокератины, CD19, CD20,

CD79a, CD10, Bcl2, Bcl6, CD23, CD34, TdT, CD3, CD4, CD5, CD8, CyclinD1, Ki67.

Для иммунофенотипирования методом проточной цитофлюориметрии (проточный цитофлюориметр FACS Calibur фирмы Becton Dickinson, США) применяли антитела фирмы DAKO, меченные флюоресцентными метками (FITC или RPE): CD45, CD19, CD20, CD79a, CD10, Bcl2, Bcl6, CD23, CD34, TdT, κ, λ, CD3, CD4, CD5, CD8, Ki67.

Флюоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) применяли в некоторых случаях для диагностики MALT-лимфом. FISH — это метод прямого выявления нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) в клеточных структурах с помощью флюоресцентно меченых зондов. Метод позволяет определить специфические нуклеотидные последовательности непосредственно в клетках, так как зонды, меченные флюорохромами, наносят прямо на клеточный образец, содержащий генетический материал, при этом морфология изучаемых клеток не меняется. Применяли два варианта FISH-метода: на гистологических срезах парафиновых блоков толщиной 4 мкм и на цитологическом материале. Разработка методики FISH на цитологическом материале позволила значительно расширить диагностические возможности цитогенетических исследований. Для дифференциальной диагностики с фолликулярной лимфомой определяли перестройку гена *Bcl2*. Применяли FISH-метод со стратегией разделения (или расщепления сигнала) в исследуемом гене без установления участника транслокации. Использовали зонд *Bcl2* (*Bcl2* FISH DNA Probe, Split Signal, фирмы DAKO). Ген человека *Bcl2* состоит из трех экзонов, охватывающих область 195 кб на длинном плече хромосомы 18 в районе 2 полосы 1 (q21). *Bcl2* FISH ДНК — смесь двух зондов: меченый техасским красным (TexRed) ДНК-зонд (*Bcl2*-вверх), охватывающий 375 кб теломерной области к точке разрыва, и ДНК-зонд (*Bcl2*-вниз), меченный флюоресцеинизотионатом (FITC), охватывающий 641 кб центромерной области к точке разрыва.

В 30—50% случаев зрелоклеточных MALT-лимфом проявляется транслокация t(11; 18) (q21; q21), которая высоко специфична, ее редко выявляют при других нозологических формах лимфом. Для диагностики ЛМЗ у трех больных с помощью FISH-метода определяли транслокацию t(11; 18) (q21; q21), вовлекающую ген ингибитора апоптоза *API2* и ген *MALT1*, которая приводила к обмену гена, локализуемого в локусе q21 (*API2*) хромосомы 11 на 18 хромосому в локус q21 (*MALT1*), что увеличивает синтез каспазы-подобной протеазы и приводит к блокированию апоптоза. Следствие такой перестройки генов — более высокая выживаемость опухо-

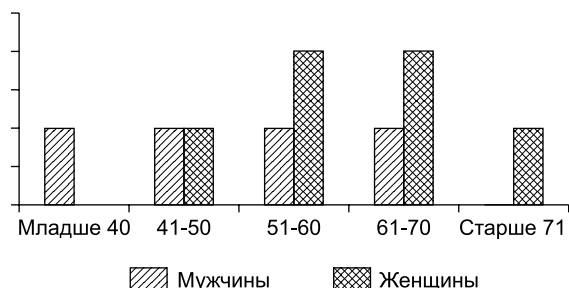


Рис. 1. Возрастные показатели больных лимфомой маргинальной зоны.

левых В-клеток. Ген человека *MALT1* состоит из 17 экзонов, охватывающих область 80 кб на хромосоме 18 в районе 2 полосы 1 (q21). Проводили FISH-исследование с зондом *MALT1* (*MALT1* FISH DNA Probe Split Signal фирмы DAKO), который представляет собой смесь двух зондов: меченный тейхасским красным (TexRed) ДНК-зонд, (*MALT1*-вверх), охватывающий 316 кб центромерной области от точки разрыва, и меченный флюоресцеинизотиоцианатом (FITC) ДНК-зонд (*MALT1*-вниз), охватывающий 508 кб теломерной области от точки разрыва.

Гибридизацию выполняли по протоколам фирмы-производителя DAKO для локус-специфических проб. Визуализацию сигналов проводили под флюоресцентным микроскопом Zeiss-Axioscope с использованием тройного фильтра DAPI/RED/GREEN. В каждом случае анализировали 200 интерфазных ядер с четкими сигналами.

Оценку результатов гибридизации ДНК-зонда *MALT1* FISH DNA Probe Split Signal фирмы DAKO проводили следующим образом. Позитивными (с транслокацией) считали ядра с одним красным, одним зеленым и одним желтым сигналами. Ядра с двумя желтыми сигналами считали негативными. Позитивный результат свидетельствовал о наличии транслокации t(11; 18)(q21; q21).

Методика FISH включала этапы депарафинизации (в случае гистологического материала), инкубации с пепсином, денатурации ДНК и гибридизации с ДНК-зондом. Основные сложности при оценке результатов, особенно старых блоков, — деформация клеток при первичной обработке формалином, их близкое расположение друг к другу, что вызывало наложение сигналов и, соответственно, проблемы при интерпретации полученных данных.

Результаты. Определена гистологическая картина ЛМЗ, которая довольно гетерогенна. В составе опухолевого инфильтрата в различных сочетаниях определяли клетки маргинальной зоны (центроцитоподобного типа), малые лимфоциты, в небольшом количестве — иммунобласты и центробласты, клетки моноцитоподобного типа (рис. 2, см. обложку). Таким образом, при гистологическом исследовании оценивали клеточный состав, атипичность опухолевых клеток, наличие плазмочитоподобной дифференцировки и плазмочитарной инфильтрации, присутствие реактивных лимфоидных фолликулов с явлениями колонизации, наличие крупных бластных клеток. При экстранодальных поражениях определяли наличие и выраженность лимфоэпителиальных поражений. Лимфоэпителиальные поражения представляли агрегаты из трех и более клеток маргинальной зоны, разрушающие эпителий желез (рис. 3, см. обложку).

Цитологическая картина ЛМЗ также гетерогенна и представлена полиморфными клетками, которые могут присутствовать в разном количестве: клетки типа малых лимфоцитов, центроцитоподобные, моноцитоподобные В-клетки, клетки с признаками плазмочитарной дифференцировки (рис. 4, см. обложку). Центроцитоподобные клетки цитологически имели мелкий и средний размер, неправильный контур ядерной мембраны, умеренно плотный хроматин, малозаметное ядрышко. В других клетках ядра имели бобовидную форму, цитоплазма была относительно обильной бледно окрашенной, что придавало клеткам моноцитоподобный вид. В ряде случаев наблюдали плазмочитоподобную дифференцировку. Возможна незначительная примесь больших клеток типа центробластов и иммунобластов. В ряде случаев встречали зрелые плазматические клетки.

Проведено параллельное изучение гистологических и цитологических препаратов больных с установленным диагнозом MALT-лимфомы.

В четырех случаях с гистологически установленным диагнозом MALT-лимфомы желудка цитограмма была представлена опухолевыми лимфоцитами мелкого и среднего размера, напоминающими центроциты: слегка плотные ядра клеток,

скудная цитоплазма, отсутствие ядрышек. Часть клеток имела моноцитоподобную морфологию: бобовидной формы ядра, обильная светлоокрашенная цитоплазма. Иногда обнаруживали отдельно расположенные клетки, сходные с центробластами или иммунобластами. Встречали плазматические клетки. Наблюдали дистрофию и распад эпителиальных клеток желез.

В двух случаях с гистологически установленным диагнозом MALT-лимфомы слюнных желез цитограмма была представлена центроцитоподобными лимфоидными и моноцитоподобными клетками, эпителиальные клетки были разрушены.

В одном случае с гистологически установленным диагнозом MALT-лимфомы легких цитограмма была представлена мономорфным клеточным составом из центроцитоподобных лимфоидных клеток.

В одном случае с гистологически установленным диагнозом MALT-лимфомы придатков глаза цитограмма была представлена моноцитоподобными и центроцитоподобными лимфоидными клетками.

В двух случаях с гистологически установленным диагнозом нодальной ЛМЗ цитограмма была полиморфна: преобладали моноцитоподобные лимфоидные опухолевые клетки с обильной светлоокрашенной цитоплазмой, встречали центроцитоподобные клетки, единичные клетки бластного типа (центробласты и иммунобласты), плазматические клетки и гранулоциты.

Рутинное цитологическое исследование 10 случаев позволило установить точный диагноз лимфомы лишь в пяти из них, без указания, что это ЛМЗ. В двух случаях при рутинном цитологическом исследовании высказано лишь подозрение на лимфому. Таким образом, для рутинной цитологии MALT-лимфом чувствительность составила 50%, специфичность — 100% и точность — 50% в установлении диагноза лимфомы без указания на тип. Возраст больных старше 50 лет, экстранодальная локализация, хроническое течение заболевания (аутоиммунные заболевания, хронические инфекции, в том числе гепатит С), типичная цитологическая картина позволили у 7 больных предположить наличие ЛМЗ.

Всем 10 больным проведено иммунофенотипирование различными методами: ИЦХ, проточная цитофлюориметрия и ИГХ (см. таблицу).

У 10 больных наблюдали положительную экспрессию пан-В-клеточных маркеров CD19, CD20, CD79a как при ИГХ, так и при ИЦХ и проточной цитофлюориметрии. Причем экспрессию пан-В-клеточных маркеров опухолевыми клетками оценивали как выраженную. У 6 (60%) больных наблюдали положительную экспрессию Bcl2 как при ИГХ, так и при ИЦХ и проточной цитофлюориметрии. При сравнении ИГХ, проточной цитофлюориметрии и ИЦХ выявлено отсутствие экспрессии CD5, CD3, CD10, CD34, CD23, Bcl6, TdT, циклина D1. При ИГХ и ИЦХ в 10 случаях белок пролиферативной активности Ki-67 составил не более 30%.

При проточной цитофлюориметрии определяли клональность по легким цепям иммуноглобулинов κ или λ (Ig λ /Ig κ).

В целом коэффициент корреляции ($r, p < 0,05$) между данными ИГХ и ИЦХ, проточной цитофлюориметрии составил 1 (рис. 5). При проточной цитофлюориметрии проводили определение клональности по легким цепям λ или κ , что не выполняли при ИГХ и ИЦХ из-за сильного фонового окрашивания (рис. 6, см. обложку).

Поскольку патогномоничные иммуноморфологические признаки при ЛМЗ отсутствуют, прежде всего необходимо исключить другие мелкоклеточные В-клеточные лимфомы. При иммуноморфологическом исследовании дифференциально-диагностическую ценность представляет сравнение экспрессии антител CD20 и CD3. При ЛМЗ наблюдали преобладание CD20-позитивных В-лимфоцитов (рис. 7, см. обложку) над CD3-позитивными Т-лимфоцитами (рис. 8, см. обложку). При реактивных процессах Т-лимфоциты преобладают над В-лимфоцитами или находятся в равном соотношении. Точ-

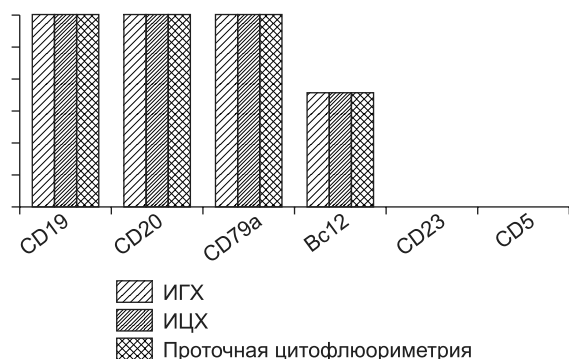


Рис. 5. Результаты иммунотипирования лимфомы маргинальной зоны. Коэффициент корреляции — 1,0 ($r, p < 0,05$).

ность иммунофенотипирования, позволяющая установить ЛМЗ, составила 100%, чувствительность — 100%, специфичность — 100%.

Четырем больным для уточнения диагноза проведена FISH-реакция. Одному больному с нодальной лимфомой проведена FISH-реакция с использованием зонда *Bcl2* (*Bcl2* FISH DNA Probe, Split Signal, Y5407) для дифференциальной диагностики с фолликулярной лимфомой. Перестройка гена *Bcl2* у больного с нодальной лимфомой маргинальной зоны не обнаружена. Для ЛМЗ наиболее частой является транслокация $t(11; 18)(q21; q21)$, которая приводит к обмену гена ингибитора апоптоза *API2*, локализующегося в локусе q21 хромосомы 11 на 18 хромосому в локус q21 в зону гена *MALT1*, отвечающего за синтез каспаза-подобной протеазы. Такая перестройка генов приводит к более высокой выживаемости опухолевых В-клеток. 3 больным (1 — с MALT-лимфомой слюнной железы, 2 — с MALT-лимфомой желудка) проведено FISH-исследование с зондами *MALT1* (*MALT1* FISH DNA Probe Split Signal фирмы DAKO). У 3 больных обнаружена перестройка гена *MALT1*. Точность, чувствительность и специфичность комплексного исследования (цитологии, ИГХ и FISH-метода) в диагностике ЛМЗ составили 100%.

Заключение. Таким образом, точность рутинного цитологического исследования при установлении диагноза лимфомы без указания на ее тип при ЛМЗ составила 50%, чувствительность — 50%, специфичность — 100%. Установить точный диагноз ЛМЗ на основании рутинного цитологического метода не представляется возможным. Можно лишь предположить наличие ЛМЗ при длительном течении хронической инфекции (хронический гастрит, связанный с *Helicobacter pylori*, поражение придатков глаза, связанных с *Chlamydia psittaci*, гепатита С) либо аутоиммунного заболевания (например, синдром Шегрена при поражении слюнных желез, тиреоидит Хашимото). Следует учитывать и цитологическую картину, которая, как правило, полиморфна и представлена клетками типа малых лимфоцитов, центроцитоподобными и моноцитоподобными В-клетками, а также клетками с плазмоцитной дифференцировкой.

Точность иммунофенотипирования, позволяющая установить ЛМЗ, составила 100%, чувствительность — 100%, специфичность — 100%. Коэффициент корреляции ($r, p < 0,05$) между данными ИГХ и ИЦХ, протоочной цитофлуориметрии составил 1. Патогномоничные иммуноморфологические признаки для ЛМЗ отсутствуют. В дифференциальной диагностике использовали метод исключения других мелко-клеточных В-клеточных лимфом. При иммуноморфологическом исследовании дифференциально-диагностическую ценность представляет сравнение экспрессии антител CD20 и CD3: преобладание CD20-позитивных В-лимфоцитов над CD3-позитивными Т-лимфоцитами, наблюдаемое при ЛМЗ.

При реактивных процессах Т-лимфоциты в лимфоидноклеточном инфильтрате преобладают над В-лимфоцитами или находятся в равном соотношении.

Точность, чувствительность и специфичность комплексного исследования (цитологии, ИЦХ и FISH-метода) в диагностике ЛМЗ составили 100%. Выявление при FISH-реакции хромосомной транслокации $t(11; 18)$ у 3 больных MALT-лимфомой необходимо для назначения рационального лечения, поскольку случаи MALT-лимфомы желудка с $t(11; 18)$ резистентны к антибактериальной терапии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2—29 см. REFERENCES)

1. Поддубная И.В., Москаленко О.А., Балакирева Ю.Н. Неходжкинские лимфомы маргинальной зоны. *Современная онкология*. 2006; 1: 8—12.

REFERENCES

1. Poddubnaya I.V., Moskalenko O.A., Balakirev Yu.N. Non-Hodgkin's lymphomas of the marginal zone. *Sovremennaya onkologiya*. 2006; 1: 8—12. (in Russian)
2. Harris N.L., Jaffe E.S., Stein H. et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994; 84(5): 1361—92.
3. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. *WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues (ed 4th)*. Lyon: IARC; 2008.
4. Armitage J.O., Weisenburger D.O. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16: 2780—95.
5. Berger F., Felman P., Thieblemont C., Pranier T., Basseggio L., Bryon P.A., Salles G., Callet-Bauchu E., Coiffier B. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood*. 2000; 95: 1950—6.
6. Mollejo M., Menarguez J., Lloret E., Sanchez A., Campo E., Algara P., Cristobal E., Sanchez E., Piris M.A. Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low-grade B-cell lymphoma. A clinicopathological study of 13 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 1995; 19: 1146—57.
7. Isaacson P.G., Matutes E., Burke M., Catovsky D. The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood*. 1994; 84: 3828—34.
8. Hammer R.D., Glick A.D., Greer J.P., Collins R.D., Cousar J.B. Splenic marginal zone lymphoma. A distinct B-cell neoplasm. *Am. J. Surg. Pathol.* 1996; 20: 613—26.
9. Melo J.V., Hegde U., Parreira A., Thompson I., Lampert I.A., Catovsky D. Splenic B cell lymphoma with circulating villous lymphocytes: differential diagnosis of B cell leukaemias with large spleens. *J. Clin. Pathol.* 1987; 40: 642—51.
10. Matutes E., Morilla R., Owusu-Ankomah K., Houlihan A., Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood*. 1994; 83: 1558—62.
11. Thieblemont C., Nasser V., Felman P., Leroy K., Gazzo S., Callet-Bauchu E., Lloriod B., Granjeaud S., Gaulard P., Haioun C., Traverse-Glehen A., Basseggio L., Bertucci F., Birnbaum D., Magrangeas F., Minvielle S., Avet-Loiseau H., Salles G., Coiffier B., Berger F., Houlgatte R. Small lymphocytic lymphoma, marginal zone B-cell lymphoma, and mantle cell lymphoma exhibit distinct gene-expression profiles allowing molecular diagnosis. *Blood*. 2004; 103: 2727—37.
12. Isaacson P.G., Du M.Q. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4: 644—653.
13. Doglioni C., Wotherspoon A.C., Moschini A., de Boni M., Isaacson P.G. High incidence of primary gastric lymphoma in north-eastern Italy. *Lancet*. 1992; 339: 834—35.
14. Pincel D. Differentiating juvenile myelomonocytic leukemia from infectious disease. *Blood*. 1998; 91: 365—7.
15. Hussell T., Isaacson P.G., Crabtree J.E., Spencer J. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 1992; 342: 571—4.
16. Cerroni L., Zochling N., Putz B., Kerl H. Infection by *Borrelia burgdorferi* and cutaneous B-cell lymphoma. *J. Cutan. Patol.* 1997; 24: 457—61.
17. Ferreri A.J., Ponzoni M., Guldoboni M., Resti A.G., Politi L.S., Cortelazzo S., Demeter J., Zallio F., Palmas A., Muti G., Dognini G.P., Pasini E., Lettini A.A., Sacchetti F., De Conciliis C., Doglioni C., Dolcetti R. Bactericidal therapy with doxycycline in ocular adnexal MALT lymphoma: a multicenter prospective trial. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98: 1375—82.
18. Lecuit M., Abachin E., Martin A., Poyart C., Pochart P., Suarez F.,

- Bengoufa D., Feuillard J., Lavergne A., Gordon J.I., Berche P., Guillemin L., Lortholary O. Immunoproliferative small intestinal disease associated with *Campylobacter jejuni*. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 239—48.
19. Isaacson P.G. Gastrointestinal lymphoma. *Hum. Patol.* 1994; 25: 1020—9.
20. Kassan S.S., Thomas T.L., Moutsopoulos H.M., Hoover R., Kimberly R.P., Budman D.R., Costa J., Decker J.L., Chused T.M. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann. Intern. Med.* 1978; 89: 888—92.
21. Aozasa K. Hashimoto's thyroiditis as a risk factor of thyroid lymphoma. *Acta Pathol. Jpn.* 1990; 40: 459—68.
22. Radaszkiewicz T., Dragosics B., Bauer P. Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: factors relevant to prognosis. *Gastroenterology* 1992; 102: 1628—38.
23. Thieblemont C., Bastion Y., Berger F., Rieux C., Salles G., Dumontet C., Felman P., Coiffier B. Mucosa-associated lymphoid tissue gastrointestinal and nongastrointestinal lymphoma behavior: analysis 108 patients. *Blood.* 1997; 95: 802—6.
24. Raderer M., Streubel B., Woehrer S., Poespoeck A., Jaeger U., Formanek M., Chott A. High relapse rate in patients with MALT lymphoma warrants lifelong follow-up. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 3349—52.
25. Woehrer S., Steubel B., Bartsch R., Chott A., Raderer M. Monoclonal immunoglobulin production is a frequent event in patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 7179—81.
26. Price S.K., Immunoproliferative small intestinal disease: a study of 13 cases with alpha heavy-chain disease. *Histopathology.* 1990; 17: 7—17.
27. Berger F., Felman P., Thieblemont C., Pradier T., Baseggio L., Bryon P.A., Salles G., Callet-Bauchu E., Coiffier B. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood.* 2000; 95: 1950—6.
28. Arcaini L., Paulli M., Burcheri S., Rossi A., Spina M., Passamonti F., Lucioni M., Motta T., Canzonieri V., Montanari M., Bonoldi E., Gallamini A., Uziel L., Crugnola M., Ramponi A., Montanari F., Pascutto C., Morra E., Lazzarino M. Primary nodal marginal zone B-cell lymphoma: clinical features and prognostic assessment of rare disease. *Br. J. Haematol.* 2007; 136: 301—4.
29. Tadesse-Heath L., Pittaluga S., Sorbara L., Bussey M., Raffeld M., Jaffe E.S. Marginal zone B-cell lymphoma in children and young adults. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003; 27: 522—531.

Поступила 30.03.17

Принята к печати 15.04.17

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.861.2.083.18

Балбуцкая А.А.¹, Дмитренко О.А.², Скворцов В.Н.¹

СОВРЕМЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КОАГУЛАЗОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *STAPHYLOCOCCUS*

¹ Белгородский филиал ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 308002, Белгород, Российская Федерация;

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва, Российская Федерация

Развитие молекулярных методов исследований в конце XX века позволило расширить номенклатуру видов, образующих род *Staphylococcus*, который в настоящее время насчитывает 51 вид и 27 подвидов. Патогенные виды рода обладают способностью коагулировать плазму крови млекопитающих, образуя группу коагулазопозитивных стафилококков (КПС), включающую 7 видов: *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi ssp. coagulans*, *S. hyicus*. В клинической практике наиболее вирулентным среди стафилококков считается *S. aureus*. Накопленные данные свидетельствуют о возрастающей этиологической значимости в инфекционной патологии человека и животных других представителей группы КПС. Пристального внимания заслуживают *Staphylococcus intermedius* группы (SIG), объединяющей три близкородственных вида: *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini*, среди которых наиболее широкое распространение получили метициллинустойчивые клоны *S. pseudintermedius*, способные вызывать различные гнойно-воспалительные заболевания у человека. Лабораторные методы, основанные на фенотипических тестах, не позволяют дифференцировать КПС из-за значительного сходства фенотипических свойств у некоторых представителей этой группы. Проведён сравнительный анализ эффективности различных методов видовой идентификации КПС: биохимического, молекулярно-генетических (мультипраймерная ПЦР (М-ПЦР) для идентификации различий структуры гена термонуклеазы, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) гена каталазы и их секвенирование), матрично-активированная лазерная десорбционная/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-ToF MS) с различными способами пробоподготовки. Исследовано 117 изолятов представителей SIG, выделенных от больных и здоровых особей мелких домашних животных, клинические изоляты от пациентов стационаров. М-ПЦР позволила идентифицировать 97% изолятов, ПДРФ-анализ — 100% изолятов, что подтверждает эффективность молекулярно-генетических методов исследования. MALDI-ToF MS требует пополнения базы данных масс-спектрометра и использование способа предварительной белковой экстракции проб для повышения эффективности видовой идентификации КПС.

Ключевые слова: коагулазоположительные стафилококки; *Staphylococcus intermedius* group (SIG); видовой идентификация, молекулярно-генетические методы; *nuc* ген; *kata* ген; времяпролетная MALDI масс-спектрометрия.

Для цитирования: Балбуцкая А.А., Дмитренко О.А., Скворцов В.Н. Современные особенности видовой идентификации коагулазоположительных бактерий рода *Staphylococcus*. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (8): 497-502. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-497-502>

Для корреспонденции: Балбуцкая Анна Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. Белгородского филиала ФГБНУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», e-mail: negra-2007@mail.ru

Balbutskaya A.A.¹, Dmitrenko O.A.², Skvortsov V.N.¹

THE MODERN CHARACTERISTICS OF SPECIES IDENTIFICATION OF COAGULASE-POSITIVE BACTERIA OF GENUS

¹The Belgorodskii branch of the Ya.R. Kovalenko All-Russian research institute of experimental veterinary medicine, 308002 Belgorod, Russia

²The academician N.F. Gamaleia research institute of epidemiology and microbiology of Minzdrav of Russia, 123098 Moscow, Russia

The development of molecular techniques of research in the end of XX century permitted to broaden nomenclature of species forming genus *Staphylococcus* that nowadays numbers 51 species and 27 sub-species. The pathogenic species of genus have a capacity to coagulate blood plasma of mammals forming group of coagulase-positive staphylococci including 7 species: *S. aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *S. hyicus*. In clinical practice, *S. aureus* is considered as the most virulent among staphylococci. The cumulated data testifies increasing etiologic significance of other representatives of group of coagulase-positive staphylococci in human and animal infection pathology. The keen attention is needed to be paid to *Staphylococcus intermedius* of group (SIG), uniting three close kindred species: *S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. delphini*. Among them the most broadly prevailed are methicillin-resistant clones of *S. pseudintermedius*, capable to bring on in patient various pyoinflammatory diseases. The laboratory methods based on phenotype tests, provide no opportunity to differentiate coagulase-positive staphylococci because of significant similarity of phenotype characteristics in certain representatives of this group. The comparative analysis was implemented concerning efficiency of various methods of species identification of coagulase-positive staphylococci: biochemical, molecular genetic (multi-primer polymerase chain reaction for identifying differences in gene structure of thermonuclease, analysis of polymorphism of lengths of restricting fragments of catalase gene and their sequencing), matrix-activated laser desorption/ionizing time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-ToF MS) with various modes of probe preparation. The analysis was applied to 117 isolates of representatives of SIG, separated from ill and healthy individuals of small domestic animals, clinical isolates from patients of hospitals. The multi-primer polymerase chain reaction permitted to identify 97% of isolates, analysis of polymorphism of lengths of restricting fragments of catalase gene - 100% of isolates that confirms efficiency of molecular genetic methods of analysis. The MALDI-ToF MS requires replenishment data base of mass-spectrometer and application of the mode of preliminary protein extraction of samples for increasing efficiency of species identification of coagulase-positive staphylococci.

Key words: coagulase-positive staphylococci; *Staphylococcus intermedius* group; species identification; molecular genetic methods; *nuc* gene; *kata* gene; matrix-activated laser desorption/ionizing time-of-flight mass-spectrometry

For citation: Balbutskaya A.A., Dmitrenko O.A., Skvortsov V.N. The modern characteristics of species identification of coagulase-positive bacteria of *Staphylococcus* genus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (8): 497-502. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-497-502>

For correspondence: Balbutskaya A.A., candidate of biological sciences, leading researcher. e-mail: nerpa-2007@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 28.03.2017
Accepted 03.04.2017

Введение. В зависимости от способности коагулировать плазму крови млекопитающих бактерии рода *Staphylococcus* делят на 2 кластера: коагулазоположительные (КПС) и коагулазоотрицательные (КОС). На протяжении десятилетий наиболее вирулентными для человека в клинической практике считали единственный коагулазоположительный вид *S. aureus* и ограниченное число видов КОС, в том числе *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. lugdunensis* и некоторые др. Согласно данным многочисленных исследований, *S. aureus* является одним из ведущих этиологических агентов, вызывающих развитие инфекций кожи и мягких тканей, пневмонии, септицемии, эндокардита, токсического шока, девайс-ассоциированных инфекций и многих других заболеваний человека и животных [1]. Появление и последующее широкое распространение эпидемических штаммов, устойчивых к метициллину/оксациллину и другим антимикробным агентам (MRSA), существенно осложняет лечение стафилококковой инфекции, требует строгого соблюдения мер инфекционного контроля и делает неотложной необходимость правильной видовой идентификации и определения чувствительности возбудителя к антимикробным препаратам [2]. Интенсивное изучение экологии *S. aureus*, предпринятое с конца 70-х годов прошлого века, и применение в дальнейшем молекулярных методов исследований позволило выделить в самостоятельные таксоны: *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, *S. lutrae*, *S. hyicus*, естественными хозяевами которых являются животные [3—8]. Из-за сходства биохимических свойств в отдельную группу — *Staphylococcus intermedius* group (SIG)

— объединены три близкородственных вида: *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius* [9]. Накапливается всё больше данных, согласно которым неуклонно растёт этиологическая значимость микроорганизмов SIG в инфекционной патологии человека, в частности у людей со сниженным иммунитетом [10, 11]. Зарегистрированы гнойно-воспалительные заболевания, связанные с укусами животных, случаи бактериемий, инфекционного эндокардита, остеомиелита, инфекции мочевыводительной системы, синусита, отита, мастоидита, случаи инфекций кожи и мягких тканей. Для человека источником возбудителей служат животные, находящиеся с ним в тесном контакте, в том числе животные-компаньоны [12—14]. Доказано, что представители SIG могут передаваться и от человека человеку [15]. *S. (pseud) intermedius* может быть этиологическим агентом пищевых отравлений. Представители вида вызвали вспышку стафилококковой токсикоинфекции в США, охватившую более 250 человек. Все изоляты продуцировали энтеротоксин А, в отличие от типовых штаммов *S. intermedius* [16]. Опубликован случай выделения мультирезистентных изолятов *S. intermedius*, в том числе устойчивых к ванкомицину, из охлаждённого мяса кур. Выделенные изоляты содержали не менее одного гена энтеротоксинов *S. aureus* [17]. Известен случай выделения MRSP из мяса верблюда [18].

Имеются лишь единичные сообщения о выделении представителей группы SIG от человека в России. При изучении этиологической структуры гнойно-септических осложнений в условиях ожогового стационара из патологического материала выделен *S. intermedius* у 9,09% больных в каче-

стве моно возбу́дителя, у 3,76% он обнаружен в составе ассоциаций. Данный микроорганизм был вторым по частоте выделения среди КПС после *S. aureus*, и, более того, от ожоговых больных *S. intermedius* изолировали чаще, чем КОС. Для идентификации возбу́дителей применяли общепринятые бактериологические методы [19]. *S. intermedius* обнаружены на предметах больничной обстановки хирургического отделения стационара и родильного дома [20], при обследовании птицефабрики — в патологическом материале птиц, у здоровых носителей из числа сотрудников птицефабрики и студентов, проходивших там практику [21]. В обоих исследованиях идентификацию проводили на основании биохимических тестов.

В отличие от КОС представители SIG, как правило, обладают большим набором факторов патогенности, включая специфические токсины (гемолизины, лейкоцидин, эксфолиативные и энтеротоксины), наличие таких ферментов, как коагулаза, протеаза, ДНК-аза, термонуклеаза, липаза и некоторых других, не позволяющих отличить эту группу микроорганизмов от *S. aureus* при использовании рутинных лабораторных тестов [10, 22]. Представители SIG, в частности эпидемические клоны *S. pseudintermedius*, способны быстро приобретать гены резистентности ко многим антимикробным средствам различных классов, используемых в медицинской практике [23]. Их устойчивость к β-лактамам антибиотикам, как и у других представителей рода, обусловлена наличием стафилококковых хромосомных кассет *mec*, однако критерии оценки чувствительности к оксациллину/метициллину у *S. aureus* и представителей SIG различны [24]. Дифференциация КПС невозможна с помощью коммерческих биохимических тест-систем и автоматических бактериологических анализаторов, так как их базы данных не содержат всего спектра представителей SIG. Из-за отсутствия характерного пигмента бактериологи ошибочно идентифицируют микроорганизмы SIG как непигментированный *S. aureus*. Сложности возникают и при идентификации нетипичных представителей SIG и *S. aureus*, обладающих замедленной реакцией плазмокоагуляции, в результате чего они могут быть отнесены к КОС.

Ведётся активный поиск генетических мишеней, позволяющих дифференцировать представителей вышеназванной группы, но исследователи так и не пришли к единому мнению об их эффективности из-за значительной степени гомологии отдельных генов у SIG и некоторых других видов стафилококка или ограниченности выборки изолятов КПС, использованных в исследованиях. Для идентификации бактерий рода *Staphylococcus*, в том числе КПС, в качестве быстрой, точной и экономически выгодной альтернативы перечисленным выше способам диагностики предложен метод матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с использованием времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS).

Цель работы — сравнить дифференцирующие возможности различных молекулярно-генетических методов и MALDI-ToF масс-спектрометрии для видовой идентификации КПС.

Материал и методы. В виду сложностей идентификации в клинических лабораториях представителей SIG — возбу́дителей заболеваний человека данное исследование выполнили на коллекции SIG, изолированных от животных-компаньонов. 112 изолятов *S. intermedius* и 5 изолятов *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, выделенные от мелких домашних животных с различными гнойно-воспалительными заболеваниями, здоровых особей в Центральном регионе России, которые идентифицированы до вида с помощью биохимической тест-системы STAPHYtest 24 (PLIVA-Lachema a.s., Чехия); 4 клинических изолята *S. intermedius*, выделенные от больного гангреной дистальных отделов конечностей и от ожоговых больных в больницах Белгорода; от пациента с остеомиелитом в Центральном институте травматологии и ортопедии им. Приорова (Москва). В качестве контрольных

использованы референтные штаммы *S. aureus* NCTC 8325, *S. intermedius* DSM 20373^T, *S. pseudintermedius* LMG 22219^T, *S. delphini* DSM 20771^T и *S. hyicus* DSM 20249^T.

Дальнейшую идентификацию выполнили с помощью мультипраймерной ПЦР (М-ПЦР) для идентификации различий структуры гена термонуклеазы (*nuc*) [25], а также метода анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) гена каталазы (*katA*) [26]. Компьютерное моделирование ПДРФ-анализа выполнили с помощью программы GENTle V1.9.4. Исследование нуклеотидной последовательности *katA* гена проводили методом секвенирования. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer. Изоляты идентифицированы методом MALDI-ToF MS анализа на масс-спектрометре AutoflexIII (Bruker Daltonics, Германия). Белковые спектры анализировали с помощью MALDI Biotyper (версия 3.0, Bruker Daltonics, Германия).

Экстракцию ДНК бактерий проводили согласно разработанной методике [27]. При постановке ПЦР использовали: Taq-полимеразу «Силекс» (Россия), праймеры синтезированы фирмой «Евроген». Рестрикцию амплифицированного фрагмента *katA* гена осуществляли эндонуклеазой TaqI (Promega, США). Детекцию продуктов амплификации и рестрикции осуществляли методом гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле с использованием гель-документирующей системы DNA Analyzer (Россия).

Результаты. Молекулярно-генетическая идентификация. По результатам амплификации гена *nuc* методом М-ПЦР с видоспецифичными праймерами 117 изолятов коллекции разделены на 4 вида КПС: 107 изолятов *S. pseudintermedius*, 2 — *S. delphini*, 1 — *S. intermedius*, 4 — *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, 3 штамма идентифицировать не удалось (рис. 1).

Для подтверждения достоверности результатов видовой идентификации, полученных при использовании амплификации фрагмента *nuc* гена, использован метод ПДРФ-анализа гена амплифицированного фрагмента *katA*. Для оценки дифференцирующей способности этого метода в исследовании включены 6 видов КПС, 31 изолят SIG, 4 *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, референтные штаммы *S. aureus* и *S. hyicus*, 3 изолята неидентифицированные с помощью М-ПЦР.

Использование эндонуклеазы *TaqI* позволило дифференцировать изоляты SIG и другие КПС. Все типовые культуры SIG и взятые в качестве контрольных ДНК изолятов *S. aureus*, *S. schleiferi* ssp. *coagulans* и *S. hyicus* имели специфические сайты рестрикции, которые показаны на рис. 2. Сравнивая полученные результаты с данными компьютерного моделирования рестрикции фрагмента *katA* гена с помощью эндонуклеазы *TaqI*, обнаружили соответствие в количестве и длине фрагментов рестрикции во всех секвенированных последовательностях, за исключением ДНК изолятов *S. hyicus*, которые в позиции 895 содержали одну нуклеотидную замену А на G, что вело к появлению нового дополнительного сайта рестрикции. Метод ПДРФ гена *katA* подтвердил результаты М-ПЦР, за исключением одного изолята. Изолят, идентифицированный в М-ПЦР как *S. intermedius*, отнесён к виду *S. schleiferi* ssp. *coagulans*. С помощью ПДРФ-анализа удалось идентифицировать изоляты, которые не образовали ампликоны в М-ПЦР. Два из трёх имели сайты рестрикции, специфичные для *S. pseudintermedius*, третий не имел сайтов рестрикции. Результаты секвенирования показали, что все участки *katA* гена КПС гомологичны соответствующему виду на 98—99%, а изолят, который не имел сайтов рестрикции, на 100% гомологичен *katA* гену *S. warneri*. Нуклеотидные последовательности участка гена *katA* исследованных изолятов добавлены в генный банк международной базы данных NCBI (KU641394—KU641400).

Изоляты *S. intermedius*, выделенные от людей, исследованы молекулярно-генетическими методами. 2 из 4 изолятов сфор-

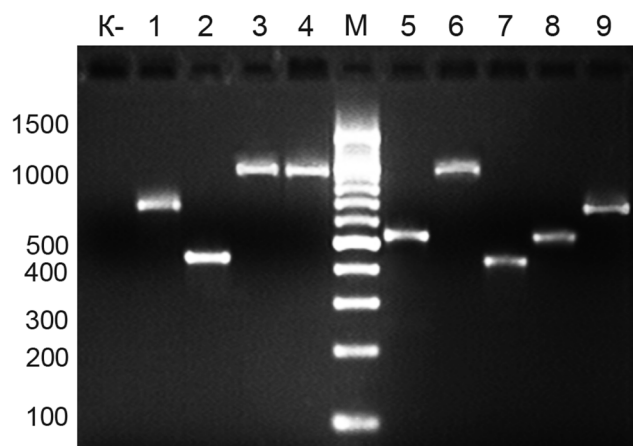


Рис. 1. Электрофореграмма М-ПЦР продуктов амплификации фрагментов пус генов различных видов коагулазоположительных стафилококков в агарозном геле.

Здесь и на рис. 2: М — ДНК-маркер (пар нуклеотидов); (К-) — отрицательный контроль.

- 1) *S. delphini*; 2) *S. intermedius* DSM 20373^T; 3) *S. pseudintermedius*; 4) *S. pseudintermedius* LMG 22219^T; 5) *S. schleiferi* ssp. *coagulans*; 6) *S. pseudintermedius*; 7) *S. intermedius*; 8) *S. schleiferi* ssp. *coagulans*; 9) *S. delphini* DSM 20771^T.

мировали ампликоны с видоспецифическими праймерами для *S. aureus* в М-ПЦР, другие 2 не идентифицированы. Анализ *katA* гена этих изолятов методом секвенирования показал гомологичность нуклеотидных последовательностей видам *S. pseudintermedius* на 99% и *S. simulans* на 95% соответственно.

MALDI-ToF MS анализ. Тестирование 117 изолятов коллекции методом MALDI-ToF масс-спектрометрии с использованием оригинальной базы данных прибора не позволило достоверно идентифицировать до вида ни один из микроорганизмов с критерием достоверности (score) от 2 до 2,3. Способом прямого нанесения образца на пластину до ро-

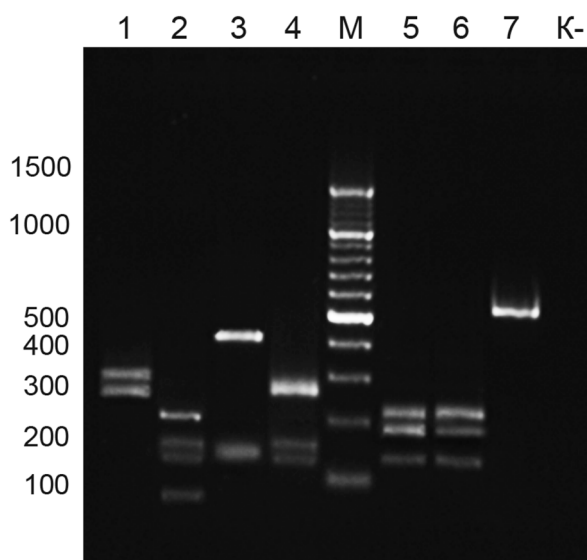


Рис. 2. *TaqI* ПДРФ-анализ гена *katA* коагулазоположительных видов стафилококка. М — 1) *S. aureus*; 2) *S. hyicus*; 3) *S. intermedius* DSM 20373^T; 4) *S. delphini* DSM 20771^T; 5) *S. pseudintermedius* LMG 22219^T; 6) *S. pseudintermedius*; 7) *S. schleiferi* ssp. *coagulans*.

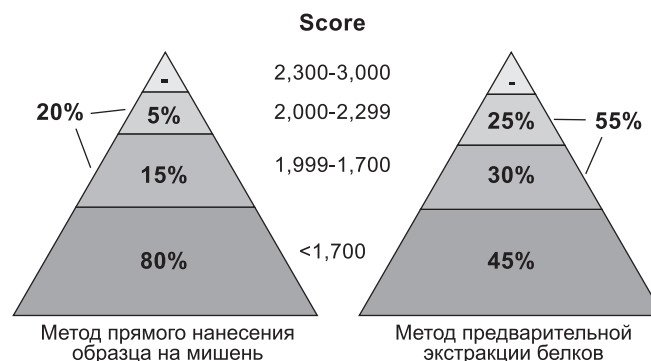


Рис. 3. Идентификация изучаемых стафилококков методом MALDI—TOF—MS.

Здесь и на рис. 4: значения score соответствуют: 2,3—3 — высокой достоверности идентификации вида; 2—2,299 — достоверной идентификации рода микроорганизма и вероятной идентификации вида; 1,999—1,7 — вероятной идентификации вида; <1,7 — отсутствие достоверной идентификации.

да идентифицировано 20% изолятов, из них только 5% до уровня вида с низкой степенью достоверности (score от 2 до 2,299). Способ предварительной экстракции белков позволил идентифицировать до рода 55% изолятов, но только 25% из них до вида со значением score от 2 до 2,299 (рис. 3). Большинство изолятов идентифицированы как *S. intermedius*, 2 изолята идентифицированы как *S. schleiferi* ssp. *coagulans* со score 2,003 и 2,293. 2 изолята — *S. delphini* со score 2,106 и 1,967. При анализе двух образцов одного изолята, включая референтные штаммы, микроорганизм мог быть отнесён с наибольшей вероятностью и к *S. pseudintermedius*, и к *S. intermedius* со score от 1,8 до 2,299.

Дифференцирующие возможности метода MALDI-ToF MS определены для 24 случайно выбранных изолятов в лаборатории микробиологии Центральной ветеринарной лаборатории земли Гессен, г. Гиссен, Германия. Идентификацию проводили с использованием внутрिलाбораторной базы данных прибора, которая, в отличие от оригинальной, содержала дополнительные масс-спектры генетически охарактеризованных изолятов SIG. Способом прямого нанесения образца на мишень удалось идентифицировать до рода 87,5% изолятов, из них только 2 изолята (8,3%) идентифицированы до вида с высоким критерием достоверности, один из которых идентифицирован как *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, другой отнесён к *S. lugdunensis*. Метод предварительной экстракции белков позволил идентифицировать до рода 100% образцов, при этом 50% идентифицированы до вида с низкой степенью достоверности со score от 2 до 2,29. Видовая принадлежность остальных 50% образцов определена с высокой степенью достоверности — значения score составляли 2,3—3 (рис. 4). Большинство изолятов (33,3%) идентифицированы как *S. pseudintermedius*, 8,3% — *S. schleiferi* ssp. *coagulans*, 4,2 — *S. intermedius*, 4,2% — *S. lugdunensis*. Результаты идентификации, полученные способом предварительной белковой экстракции, соответствовали данным молекулярной идентификации за исключением одного изолята. Изолят *S. pseudintermedius* ошибочно идентифицирован как *S. lugdunensis* при использовании обоих способов подготовки проб.

Сравнительная оценка двух способов пробоподготовки выявила необходимость использования метода предварительной экстракции белков с добавлением муравьиной кислоты и ацетонитрила. Даже применение этого способа подготовки проб может привести не только к ошибочной дифференциации внутри группы КПС, но к идентификации некоторых коагулазоположительных видов, как КОС.

Обсуждение. В последнее десятилетие для дифференциации КПС предложено большое количество генетических мише-

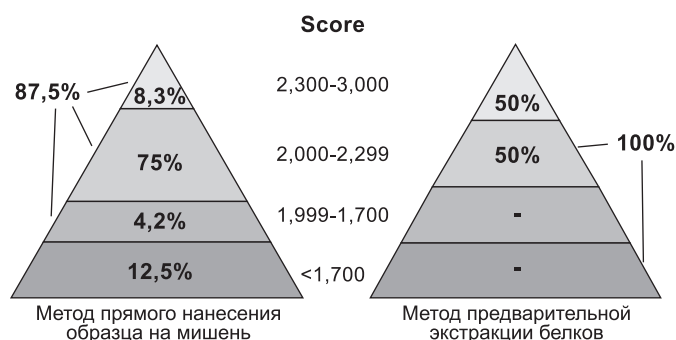


Рис. 4. Идентификация изучаемых стафилококков методом MALDI—TOF-MS с использованием внутрिलाбораторной базы данных масс-спектров.

ней, эффективность которых так и не подтвердилась. Секвенирование гена *16S рДНК* позволяет идентифицировать только 2% представителей рода *Staphylococcus* из-за высокой степени гомологии нуклеотидных последовательностей этого гена среди различных видов стафилококка [28]. Секвенирование некоторых генов домашнего хозяйства по отдельности (*hsp60*, *tuf*, *pta* и др.) не позволяет установить видовую принадлежность всех видов КПС по той же причине [9; 25]. Исследования по изучению возможности использования других генетических мишеней (*gap*, *nuc*, *kat* и др.) либо выполнены на ограниченной выборке, в том числе изолятов SIG, либо не включали всех видов КПС [26, 29]. По результатам данной работы удалось установить, что оба исследованных гена: *nuc* и *kataA* являются эффективными мишенями для идентификации КПС и их дифференциации от прочих видов стафилококка. Метод М-ПЦР для идентификации структурных различий *nuc* гена обладает высокой дифференцирующей способностью (97%), легко воспроизводим, позволяет получать надёжные результаты в короткие сроки. ПДРФ-анализ *kataA* гена с помощью эндонуклеазы *TaqI* наиболее эффективный для дифференциации представителей группы *S. intermedius* и других КПС, он позволяет безошибочно идентифицировать 100% изолятов, однако является более трудоёмким по сравнению с М-ПЦР. Оба метода могут быть рекомендованы для использования в клинических и научных лабораториях при диагностике стафилококковой инфекции.

Невысокая результативность способа прямого нанесения на мишень и невозможность использования стандартной базы данных масс-спектрометра MALDI Biotyper (версия 3.0, Bruker Daltonics, Германия) для идентификации микроорганизмов группы SIG подтверждены результатами других учёных, проводивших подобные исследования [30].

Накопленные данные о формировании множественной антибиотикорезистентности и приобретении детерминант патогенности представителями SIG, эпидемическое распространение определённых клонов *S. pseudintermedius* на территории целого ряда европейских государств и стран Северной Америки, способность вызывать заболевания не только у широкого круга млекопитающих, но и человека, делают неотложной необходимость внедрять молекулярно-генетические методы видовой идентификации КПС в работу бактериологических лабораторий. Особенно важно их использовать в случае выделения от пациентов нетипичных *S. aureus* от больных, страдающих вторичными иммунодефицитами и имеющих в анамнезе контакт с животными-компаньонами.

Выводы. 1. Точная идентификация коагулазоположительных видов стафилококков и их дифференциация от прочих видов возможна только при обязательном использовании молекулярно-генетических методов диагностики. Эффективными генетическими мишенями являются гены термонуклеазы (*nuc*) и каталазы (*kat*), которые позволяют дифференцировать 97—100% изолятов.

2. Для повышения качества идентификации представителей SIG методом MALDI-ToF MS необходимо пополнение оригинальной базы данных прибора дополнительными масс-спектрами микроорганизмов SIG, выделенных на различных географических территориях и использование при пробоподготовке способа предварительной белковой экстракции.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—9, 11—18, 22—26, 28—30 см. REFERENCES)

1. Дмитренко О.А., Балбуцкая А.А., Скворцов В.Н. Особенности экологии, патогенные свойства и роль представителей группы *Staphylococcus intermedius* в инфекционной патологии животных и человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2016; 34(3): 4—11.
2. Воробьева О.Н., Денисенко Л.И., Жилина Н.М. Этиология гнойно-септических процессов у ожоговых больных. *Бюллетень СО РАМН*. 2010; 30 (6): 57—63.
3. Аكوпова И.С., Коленчукова О.А. *Науки о человеке: Некоторые особенности внутрибольничных штаммов микроорганизмов рода Staphylococcus*. Томск: СГМУ; 2002: 4—5.
4. Гордина Е.М., Горовиц Э.С., Поспелова С.В., Афанасьевская Е.В. Видовой спектр и биологические свойства стафилококков, изолированных от птиц, в условиях крупной птицефабрики. *Медицинский альманах*. 2014; 2(32): 84—7.
5. Дмитренко О.А., Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. Исследование полиморфизма *tes* ДНК у метициллинрезистентных штаммов золотистого стафилококка, выделенных в стационарах разных регионов России. *Молекулярная генетика, микробиология, и вирусология*. 2005; 3: 11—7.

REFERENCES

1. Lowy F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339: 520—32.
2. Grundmann H., Aanensen D.M., van den Wijngaard C.C., Spratt B.G., Harmsen D., Friedrich A.W. et al. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med.* 2010; 7(1): e1000215.
3. Hajek V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1976; 26(4): 401—8.
4. Valardo P.E., Kilpper-Baelz R., Biavasco F., Satta G., Schleifer K. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. of Syst. Bact.* 1988; 38: 436—9.
5. Devriese L.A., Hajek V., Oeding P., Meyer S.A., Schleifer K.H. *Staphylococcus hyicus* comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 1978; 28: 482—90.
6. Igimi S., Takahashi E., Mitsuoka T. *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990; 40: 409—11.
7. Devriese L.A., Vancanneyt M., Baele M., Vaneechoutte M., De Graef E., Snauwaert C. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2005; 55: 1569—73.
8. Foster G., Ross H.M., Hutson R.A., Collins M.D. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 65: 1571—8.
9. Sasaki T., Takahashi N., Kamata S., Hiramatsu K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(9): 2770—8.
10. Dmitrenko O.A., Balbutskaya A.A., Skvortsov V.N. Ecological features, pathogenic properties, and role of *Staphylococcus intermedius* group representatives in animal and human infectious pathology. *Молекулярная Генетика, Микробиология и Вирусология*. 2016; 34(3): 4—11. (in Russian)
11. Starlander G., Börjesson S., Grönlund-Andersson U., Tellgren-Roth C., Melhus A. Cluster of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in humans in a tertiary hospital. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(8): 3118—20.
12. Durdik P., Fedor M., Jesenak M., Hamzikova J., Knotkova H., Banovcin P. *Staphylococcus intermedius* — rare pathogen of acute meningitis. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; 14: 236—8.
13. Kelesidis T., Tsiodras S. *Staphylococcus intermedius* is not only a zoonot-

- ic pathogen, but may also cause skin abscesses in humans after exposure to saliva. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; 14: 838—41.
14. Somayaji R., Priyantha M.A., Rubin J.E., Church D. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2016; 85(4): 471—6.
 15. Guardabassi L., Loeber M.E., Jacobson A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Veterinary Microbiology.* 2004; 98: 23—7.
 16. Khambarty F.M., Bennett R.W., Shah D.B. Application of pulsed-gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol. Infect.* 1994; 113: 75—81.
 17. Martins P.D., de Almeida T.T., Basso A.P., de Moura T.M., Frazzon J., Tondo E.C. et al. Coagulase-positive *staphylococci* isolated from chicken meat: pathogenic potential and vancomycin resistance. *Foodborne Pathog. Dis.* 2013; 10: 771—6.
 18. Al-Tarazi Y.H., Albetar M.A., Alaboudi A.R. Biotyping and enterotoxigenicity of staphylococci isolated from fresh and frozen meat marketed in Jordan. *Food Research International.* 2009; 42: 374—9.
 19. Vorob'eva O.N., Denisenko L.I., Zhilina N.M. The etiology of septic processes in burn patients. *Byulleten' SO RAMN.* 2010; 30(6): 57—63. (in Russian)
 20. Akopova I.S., Kolenchukova O.A. Science of man: Some features of nosocomial microorganism strains of the *Staphylococcus* genus [Nauki o cheloveke: Nekotorye osobennosti vnutribol'nichnykh shtammov mikroorganizmov roda *Staphylococcus*]. Tomsk: SGMU; 2002. (in Russian)
 21. Gordina E.M., Gorovits E.S., Pospelova S.V., Afanasevskaya E.V. Species spectrum and biological properties of staphylococci isolated from birds in a large poultry farm. *Meditsinskiy almanakh.* 2014; 2(32): 84—7 (in Russian)
 22. Ben Zakour N.L., Beatson S.A., van den Broek A.H., Thoday K.L., Fitzgerald J.R. Comparative genomic study of the *Staphylococcus intermedius* group of animal pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2012; 2: 1—15.
 23. Perreten V., Kadlec K., Schwarz S., Grönlund Andersson U., Finn M., Greko C. et al. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multi-centre study. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65(5): 1145—54.
 24. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals: Approved Standard - Third Edition. CLSI document M31-A3. 2010; 28(8).
 25. Sasaki T., Tsubakishita S., Tanaka Y., Sakusabe A., Ohtsuka M., Hirota S. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(3): 765—9.
 26. Blaiotta G., Fusco V., Ercolini D., Pepe O., Coppola S. Diversity of *Staphylococcus* species strains based on partial *kat* (catalase) gene sequences and design of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for identification and differentiation of coagulase-positive species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(1): 192—201.
 27. Dmitrenko O.A., Shaginyan I.A., Gintsburg A.L. Study of *mec* DNA polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in hospitals of different Russian regions. *Molecularnaya Genetika, Mikrobiologiya, i Virusologiya.* 2005; 3: 11—7. (in Russian)
 28. Woo P.C., Teng J.L., Wu J.K., Leung F.P., Tse H., Fung A.M. et al. Guidelines for interpretation of 16S rRNA gene sequence-based results for identification of medically important aerobic Gram-positive bacteria. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58(8): 1030—6.
 29. Yugueros J., Temprano A., Berzal B., Sánchez M., Hernanz C., Luengo J.M. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(12): 4351—5.
 30. Murugaiyan J., Walther B., Stamm I., Abou-Elnaga Y., Brueggemann-Schwarze S., Vincze S. et al. Species differentiation within the *Staphylococcus intermedius* group using a refined MALDI-ToF MS database. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20(10): 1007—15.

Поступила 28.03.17
Принята к печати 03.04.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.33:579.871.1.015.8

Харсеева Г.Г.¹, Воронина Н.А.¹, Гасретова Т.Д.¹, Тюкавкина С.Ю.¹, Сылка О.И.¹, Миронов А.Ю.²

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ШТАММОВ *CORYNEBACTERIUM NON DIPHTHERIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ В СТАЦИОНАРАХ РОСТОВА-НА-ДОНУ И РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», 344022, Ростов-на-Дону;

² ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва

Цель работы — изучение чувствительности к антибактериальным препаратам различных видов *Corynebacterium non diphtheriae*. Штаммы *C. non diphtheriae* выделены от больных с патологией респираторного и урогенитального тракта, а также людей, проходивших профилактическое обследование. Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде на основании значений минимальной подавляющей концентрации (мг/л). Установлено, что наиболее эффективными антибактериальными препаратами в отношении штаммов *C. non diphtheriae*, в целом оказались ванкомицин, цефазолин и цефотаксим, а отдельных видов — *C. pseudodiphtheriticum* — цефазолин, цефотаксим, гентамицин; *C. pseudotuberculosis* — ванкомицин, цефазолин, цефотаксим, гентамицин; *C. xerosis* — цефотаксим; *C. striatum* — цефазолин и рифампицин. Наименьшую эффективность проявили для штаммов *C. non diphtheriae*, в целом бензилпенициллин и линкомицин, а отдельных видов — *C. pseudodiphtheriticum* и *C. pseudotuberculosis* — линкомицин и эритромицин; *C. xerosis* и *C. striatum* — бензилпенициллин, линкомицин и эритромицин. В качестве препаратов выбора в отношении различных видов *C. non diphtheriae* можно рекомендовать цефалоспорины (цефотаксим и цефазолин), резервных препаратов — гентамицин и ванкомицин.

Ключевые слова: *Corynebacterium non diphtheriae*; антибиотикоустойчивость; количество чувствительных и резистентных штаммов.

Для цитирования: Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Гасретова Т.Д., Тюкавкина С.Ю., Сылка О.И., Миронов А.Ю. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, выделенных в стационарах Ростова-на-Дону и Ростовской области. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (8): 502-506. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-502-506>

Для корреспонденции: Харсеева Галина Георгиевна, д-р мед. наук, проф., зав. каф. микробиологии и вирусологии № 2 ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет»; e-mail: galinagh@bk.ru

Kharseeva G.G.¹, Voronina N.A.¹, Gasretova T.D.¹, Tyukavkina S.Yu.¹, Sylka O.I.¹, Mironov A.Yu.²

THE SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS OF CORYNEBACTERIUM NON DIPHTHERIAE ISOLATED IN HOSPITALS OF ROSTOV-ON-DON AND THE ROSTOVSKAIA OBLAST

¹The Rostovskii state medical university, 344022 Rostov-on-Don, Russia

²The G.N. Gabrichevskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor, 125212 Moscow, Russia

The purpose of study is to analyze sensitivity of various species *Corynebacterium non diphtheriae* to antibacterial pharmaceuticals. The strains of *C. non diphtheriae* are separated from patients with pathology of respiratory and urogenital tract and also from individuals subjected to preventive examination. The sensitivity to antibacterial pharmaceuticals was determined using technique of serial dilution in fluid growth medium on the basis values of minimal inhibitory concentration (mg per l). It is established that the most efficient antibacterial pharmaceuticals in the case of strains *C. non diphtheriae* proved to be Vancomycin, Cefazolin and Cefotaxime in general. In case of such particular species as *C. pseudodiphtheriticum* -- Cefazolin, Cefotaxime and Gentamycin; *C. pseudotuberculosis* -- Vancomycin, Cefazolin, Cefotaxime and Gentamycin; *C. xerosis* -- Cefotaxime; *C. striatum* -- Cefazolin and u Rifampicin. The least efficiency was manifested for strains *C. non diphtheriae* by Benzylpenicillin and Lincomycin in general. In case of such particular species as *C. pseudodiphtheriticum* and *C. pseudotuberculosis* -- Lincomycin and Erythromycin; *C. xerosis* and *C. striatum* -- Benzylpenicillin, Lincomycin and Erythromycin. In case of various species of *C. non diphtheriae* Cephalosporins (Cefotaxime and Cefazolin) can be recommended as pharmaceuticals of choice and Gentamycin and Vancomycin as reserve pharmaceuticals.

Key words: *Corynebacterium non diphtheriae*; antibiotic sensitivity; number of sensitive and resistant strains

For citation: Kharseeva G.G., Voronina N.A., Gasretova T.D., Tyukavkina S.Yu., Sylka O.I., Mironov A.Yu. The sensitivity to antibiotics of *Corynebacterium non diphtheriae* isolated in hospitals of Rostov-on-Don and the Rostovskaia oblast. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (8): 502-506. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-502-506>

For correspondence: Kharseeva G.G., doctor of medical sciences, professor, head of the chair of microbiology and virology №2. e-mail: galinagh@bk.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 15.12.2016
Accepted 15.01.2017

Введение. *Corynebacterium non diphtheriae* (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium riegelii*, *Corynebacterium striatum* и др.) могут быть причиной развития воспалительных заболеваний различной локализации, особенно у пациентов с нарушениями иммунной системы, а также с мультисистемной патологией, в частности пожилых [1—3]. Ранее считалось, что *C. non diphtheriae*, за исключением *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*, не патогенны для человека. Однако в настоящее время *C. non diphtheriae* выделяют от пациентов с острыми заболеваниями верхних дыхательных путей, гнойно-септическими процессами, патологией уrogenитального тракта, кожи и др. [4—7]. Формирование устойчивости многих видов коринебактерий к одному или нескольким антибактериальным препаратам способствует их распространению в популяции, в том числе и как возбудителей внутрибольничных инфекций [1, 8]. Антибиотикостойчивость *C. non diphtheriae*, особенно ассоциированных с другими микроорганизмами, к двум и более антибактериальным препаратам обуславливает более тяжелое и длительное течение заболевания [8]. Актуален для борьбы с воспалительными заболеваниями, при которых выделяются *C. non diphtheriae*, оптимальный подбор антибактериальных препаратов на основе определения антибиотикочувствительности и резистентности коринебактерий.

Цель исследования — изучение чувствительности к антибактериальным препаратам различных видов *C. non diphtheriae*.

Материал и методы. Исследованы 73 штамма *C. non diphtheriae* (*C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, *C. amycolatum*, *C. striatum*, *C. ulcerans*), выделенные с 2009 по 2011 г. из верхних дыхательных путей (зев, нос) от больных с острым и хроническим тонзиллитом, ангиной, из уrogenитального тракта (влагалище, цервикальный канал, моча), от пациентов с острым колпитом, острым и хроническим пиелонефритом, а также от проходивших про-

филактическое обследование. Штаммы *C. non diphtheriae* идентифицировали бактериологическим методом в соответствии с методическими рекомендациями [9], а также секвенированием по 16S рРНК с помощью праймеров для коринебактерий (ЗАО «Синтол», Москва). Результаты сравнивали с базами данных геномных последовательностей (рибосомная дифференциация микроорганизмов, GenBank).

Определение чувствительности штаммов недифтерийных коринебактерий к антибактериальным препаратам (бензилпенициллину, цефотаксиму, цефазолину, эритромицину, гентамицину, рифамицину, линкомицину, ванкомицину) проводили методом серийных разведений (микрометодом) в жидкой питательной среде [10]. Результаты оценивали по значениям минимальной подавляющей концентрации (МПК), мг/л, при которой наблюдали полную задержку роста исследуемого микроорганизма. Для контроля метода использовали чувствительные к антибиотикам эталонные штаммы *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27853, полученные из ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора. Для характеристики степени чувствительности коринебактерий к антибактериальным препаратам вычисляли МПК для 50 и 90% исследованных штаммов, а также определяли количество чувствительных и резистентных штаммов *C. non diphtheriae* [11, 12].

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью программы *Statistica 7.0* (StatSoft Inc., США) и *MedCalc* (версия 9.3.5.0).

Результаты и обсуждение. При исследовании чувствительности различных видов *C. non diphtheriae* к антибактериальным препаратам путем определения МПК₅₀, МПК₉₀ (табл. 1) установлено, что эти показатели при исследовании *C. pseudodiphtheriticum* были минимальны для ванкомицина, цефазолина, цефотаксима и гентамицина; *C. pseudotuberculosis* — ванкомицина, цефазолина, цефотаксима и гентамицина; *C. xerosis* — цефотаксима; *C. amycolatum* — бензилпенициллина; *C. striatum* — цефазолина. При определении чув-

Чувствительность различных видов *C. non diphtheriae* к антибактериальным препаратам (МПК₅₀, МПК₉₀)

Антибактериальные препараты МПК, мг/л	Вид					<i>C. non diphtheriae</i>
	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	<i>C. pseudotuberculosis</i>	<i>C. xerosis</i>	<i>C. amycolatum</i>	<i>C. striatum</i>	
Ванкомицин						
МПК ₅₀	≤ 0,019	≤ 0,019	≤ 0,019	≥ 5	2,5	≤ 0,019
МПК ₉₀	0,312	0,625	≥ 5	≥ 5	2,5	2,5
Линкомицин						
МПК ₅₀	0,312	2,5	0,312	0,625	≥ 5	0,312
МПК ₉₀	≥ 5	≥ 5	≥ 5	0,625	≥ 5	≥ 5
Цефазолин						
МПК ₅₀	≤ 0,019	≤ 0,019	≤ 0,019	≥ 5	0,157	≤ 0,019
МПК ₉₀	2,5	0,157	≥ 5	≥ 5	0,312	2,5
Цефотаксим						
МПК ₅₀	≤ 0,019	≤ 0,019	≤ 0,019	≥ 5	2,5	≤ 0,019
МПК ₉₀	2,5	1,25	0,625	≥ 5	2,5	0,625
Бензилпенициллин						
МПК ₅₀	0,039	0,039	0,312	0,157	≥ 5	0,157
МПК ₉₀	2,5	2,5	2,5	0,312	≥ 5	2,5
Гентамицин						
МПК ₅₀	≤ 0,019	0,078	0,625	≥ 5	≥ 5	0,039
МПК ₉₀	0,078	0,625	≥ 5	≥ 5	≥ 5	≥ 5
Эритромицин						
МПК ₅₀	0,312	0,078	0,078	≥ 5	≥ 5	0,157
МПК ₉₀	2,5	≥ 5	≥ 5,0	≥ 5	≥ 5	≥ 5
Рифампицин						
МПК ₅₀	0,078	0,157	≤ 0,019	≥ 5	0,625	0,078
МПК ₉₀	2,5	≥ 5	≥ 5	≥ 5	0,625	2,5

ствительности *C. non diphtheriae* к антибактериальным препаратам в целом установили, что на основании расчета показателей МПК₅₀, МПК₉₀ наиболее эффективными оказались ванкомицин, цефазолин и цефотаксим.

На основании полученных величин МПК все исследованные виды *C. non diphtheriae* разделили на чувствительные и резистентные. Для разграничения этих категорий чувствительности (или резистентности) между собой использовали пограничные концентрации МПК антибиотика, которые сравнивали с показателями NCCLS (Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам США), а также показателями EUCAST (Европейский комитет по тестированию антимикробной восприимчивости) для коринебактерий [11, 12].

При определении количества чувствительных (табл. 2) к антибактериальным препаратам коринебактерий установлено, что все исследованные штаммы *C. pseudodiphtheriticum* (100%) были чувствительны к ванкомицину, цефотаксиму и гентамицину, 85,7% из них — к цефазолину. Наименьшее количество штаммов *C. pseudodiphtheriticum* проявляло чувствительность к линкомицину (47,6%) и рифампицину (42,9%). При исследовании *C. pseudotuberculosis* наибольшее количество штаммов (91,7%) были чувствительны к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму и гентамицину, наименьшее (33,3%) — к линкомицину и рифампицину. Количество чувствительных к указанным антибактериальным препаратам штаммов *C. xerosis* находилось в пределах 28—88%, при-

Количество чувствительных к антибактериальным препаратам штаммов *C. non diphtheriae*, %

Вид	Количество штаммов	Антибактериальные препараты, M ± m							
		ванкомицин	линкомицин	цефазолин	цефотаксим	бензилпенициллин	гентамицин	эритромицин	рифампицин
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	21	21	10	18	21	14	21	15	9
		100	47,6 ± 10,9	85,7 ± 7,6	100	66,7 ± 10,3	100	71,4 ± 9,9	42,9 ± 10,8
<i>C. pseudotuberculosis</i>	12	11	4	11	11	7	11	5	4
		91,7 ± 8,0	33,3 ± 13,6	91,7 ± 8,0	91,7 ± 8,0	58,3 ± 14,2	91,7 ± 8,0	41,6 ± 14,2	33,3 ± 13,6
<i>C. xerosis</i>	25	18	14	21	22	7	15	13	12
		72 ± 8,9	56 ± 9,9	84 ± 7,3	88 ± 6,5	28 ± 9	60 ± 9,8	52 ± 10	48 ± 10
<i>C. amycolatum</i>	5	4	4	3	4	2	4	3	3
<i>C. striatum</i>	8	7	3	8	6	2	6	4	5
<i>C. ulcerans</i>	2	2	1	2	2	1	2	2	0
<i>C. non diphtheriae</i>	73	63	36	63	66	33	59	42	33
		86,3 ± 4	49,3 ± 5,9	86,3 ± 4	90,4 ± 3,4	45,2 ± 5,8	80,8 ± 4,6	57,5 ± 5,8	45,2 ± 5,8

Количество резистентных к антибактериальным препаратам штаммов *C. non diphtheriae*, %

Вид	Количество штаммов	Антибактериальные препараты, $M \pm m$							
		ванкомицин	линкомицин	цефазолин	цефотаксим	бензилпенициллин	гентамицин	эритромицин	рифампицин
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	21	0	11	0	0	7	0	1	4
			52,4 ± 10,			33,3 ± 10,3		4,8 ± 4,7	19,0 ± 8,6%
<i>C. pseudotuberculosis</i>	12	1	8	0	1	5	1	5	5
		8,3 ± 8%	66,7 ± 13,6		8,3 ± 8	41,7 ± 14,2	8,3 ± 8	41,7 ± 14,2	41,7 ± 14,2
<i>C. xerosis</i>	25	7	11	3	3	18	10	10	9
		28 ± 9	44 ± 9,9	12 ± 6,5	12 ± 6,5	72 ± 9	40 ± 9,8	40 ± 9,8	36 ± 9,6
<i>C. amycolatum</i>	5	1	1	2	1	3	1	2	1
<i>C. striatum</i>	8	1	5	0	0	6	2	3	1
<i>C. ulcerans</i>	2	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>C. non diphtheriae</i>	73	10	37	5	5	40	14	21	20
	100	13,7 ± 4	50,7 ± 5,9	6,8 ± 2,9	6,8 ± 2,9	54,8 ± 5,8	19,2 ± 4,6	28,8 ± 5,3	27,4 ± 5,2

чем наибольшее количество штаммов были чувствительны к цефотаксиму и цефазолину (88 и 84% соответственно). Наименьшее количество штаммов проявляли чувствительность к бензилпенициллину (28%). Четыре из пяти исследованных штаммов *C. amycolatum* оказались чувствительны к ванкомицину, линкомицину, цефотаксиму и гентамицину. При этом только 2 штамма проявляли чувствительность к бензилпенициллину. Все 8 исследованных штаммов *C. striatum* оказались чувствительными к цефазолину, к ванкомицину — 7 штаммов. Наименьшее количество из 8 исследованных штаммов *C. striatum* проявляли чувствительность к линкомицину и бензилпенициллину (3 и 2 штамма соответственно). При исследовании двух штаммов *C. ulcerans* выяснили, что оба они оказались чувствительными к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму, гентамицину и эритромицину, в то время как к линкомицину и бензилпенициллину проявил чувствительность только один из штаммов, а к рифампицину чувствительность отсутствовала.

В результате сравнения количества чувствительных к указанным антибактериальным препаратам всех исследованных видов *C. non diphtheriae* установлено, что большинство штаммов (80,8—90,4%) были чувствительны к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму и гентамицину, тогда как наименьшее количество штаммов коринебактерий проявляли чувствительность к бензилпенициллину и рифампицину (45,2% штаммов).

При определении количества резистентных (табл. 3) к антибактериальным препаратам коринебактерий установлено, что среди всех исследованных штаммов *C. pseudodiphtheriticum* не обнаружены резистентные штаммы к ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму и гентамицину. Количество резистентных штаммов *C. pseudodiphtheriticum* к эритромицину, рифампицину, бензилпенициллину и линкомицину находилось в пределах 4,8—52,4%, причем наибольшее количество штаммов были резистентны к линкомицину (52,4%), а наименьшее — к эритромицину (4,8%). При исследовании *C. pseudotuberculosis* резистентных штаммов к цефазолину не обнаружено, к ванкомицину, цефотаксиму и гентамицину их количество минимально (8,3%), а к линкомицину — максимально (66,7% штаммов). Количество резистентных ко всем указанным антибактериальным препаратам штаммов *C. xerosis* находилось в пределах 12—72%, причем наибольшее количество штаммов резистентны к бензилпенициллину (72%), наименьшее — к цефазолину и цефотаксиму (12%); 3 из 5 исследованных штаммов *C. amycolatum* были резистентны к бензилпенициллину. При этом у только у 1 штамма выявлена резистентность к ванкомицину, линкомицину, цефотаксиму, гентамицину и рифампицину. При исследовании *C. striatum* ни у одного из штаммов не была обнаружена резистентность к цефазолину и цефотаксиму. Наибольшее число

штаммов (6 из 8 исследованных) проявляли резистентность к бензилпенициллину, наименьшее (1 штамм) — к ванкомицину и рифампицину. При исследовании двух штаммов *C. ulcerans* к линкомицину и бензилпенициллину проявил резистентность один из них, тогда как к большинству других антибактериальных препаратов — ванкомицину, цефазолину, цефотаксиму, гентамицину, эритромицину и рифампицину — резистентных штаммов не обнаружено.

По результатам определения количества резистентных к указанным антибактериальным препаратам всех исследованных видов *C. non diphtheriae* установлено, что к бензилпенициллину и линкомицину проявляли резистентность 54,8 и 50,7% штаммов соответственно, тогда как к цефотаксиму, цефазолину и ванкомицину количество резистентных штаммов коринебактерий (6,8, 6,8 и 13,7% штаммов соответственно) было наименьшим.

Выводы. На основании полученных данных (МПК₅₀, МПК₉₀, количество чувствительных и резистентных штаммов) установлено, что наиболее эффективными антибактериальными препаратами в отношении штаммов *C. non diphtheriae* в целом стали ванкомицин, цефазолин и цефотаксим, а отдельных видов — *C. pseudodiphtheriticum* — цефазолин, цефотаксим, гентамицин; *C. pseudotuberculosis* — ванкомицин, цефазолин, цефотаксим, гентамицин; *C. xerosis* — цефотаксим; *C. striatum* — цефазолин и рифампицин. Наименьшую эффективность проявили в отношении штаммов *C. non diphtheriae* в целом бензилпенициллин и линкомицин, а отдельных видов — *C. pseudodiphtheriticum* и *C. pseudotuberculosis* — линкомицин и эритромицин; *C. xerosis* и *C. striatum* — бензилпенициллин, линкомицин и эритромицин.

В качестве препаратов выбора в отношении различных видов *C. non diphtheriae* можно рекомендовать цефалоспорины (цефотаксим и цефазолин), резервных препаратов — гентамицин и ванкомицин.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4—8, 11—12
см. REFERENCES)

- Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Миронов А.Ю., Харисова А.Р. Антибиотикоустойчивость штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в городе Ростове-на-Дону и Ростовской области. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; (10): 62—4.
- Костюкова Н.Н. Возбудитель дифтерии и условно-патогенные коринебактерии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2001; (6): 25—31.
- Методические указания МУК 4.2.3065—13. *Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции*. М.; 2013.

10. Методические указания МУК 4.2.1890—04. *Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам*. М.; 2004.

REFERENCES

1. Kharseeva G.G., Voronina N.A., Mironov A.Yu., Kharisova A.R. Antibiotic susceptibility strains of *Corynebacterium non diphtheriae*, circulating in Rostov-on-Don and the Rostov region. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; (10): 62—4. (in Russian)
2. Funke G., von Graevenitz A., Clarridge J.E., Bernard K.A. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10(1): 125—59.
3. Kostyukova N.N. The causative agent of diphtheria and opportunistic *Corynebacterium*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2001; (6): 25—31. (in Russian)
4. Kaufman D., Ott P., Ruegg C. Laryngopharyngitis by *Corynebacterium ulcerans*. *Infection*. 2002; 30(3): 168—70.
5. Knox K., Holmes A.H. Nosocomial endocarditis caused by *Corynebacterium amycolatum* and other nondiphtheriae *Corynebacterium*. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(1): 97—9.
6. Izurieta H.S., Strebel P.M., Youngblood T., Hollis D.G., Popovic T. Exudative pharyngitis possibly due to *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, a new challenge in the differential diagnosis of diphtheria: report of a case and review. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 3(1): 65—8.
7. Ferrer I., Marne C., Revillo M.J., López A.I., Velasco J.J., García-Moya J.B. et al. Infección urinaria por *Corynebacterium riegelsii*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2001; 19(6): 284—5. (in Spanish)
8. Reddy B.S., Chaudhury A., Kalawat U., Jayaprada R., Reddy G., Ramana B.V. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). *Indian J. Med. Microbiol.* 2012; 30(1): 52—7.
9. Guidelines MUK 4.2.3065—13. *Control methods. Biological and microbiological factors. Laboratory diagnosis of diphtheria infection. [Metody kontrolya. Biologicheskie i mikrobiologicheskie faktory. Laboratornaya diagnostika difteriyonoy infektsii]*. Moscow; 2013. (in Russian)
10. Guidelines MUK 4.2.1890—04. *Determination of the sensitivity of microorganisms to antibiotics. [Opredelenie chuvstvitelnosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam]*. Moscow; 2004. (in Russian)
11. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement M100-S25. 2015; 35(3): 1—231.
12. EUCAST Definitive document. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Infect.* 1998; 4(5): 291—6.

Поступила 15.12.16

Принята к печати 15.01.17

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.314.17-002.2-085.837.3.015.2:615.831]-078-076.4

Царев В.Н., Подпорин М.С., Ипполитов Е.В.

ПРИМЕНЕНИЕ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ И БИОРЕАКТОРА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭРАДИКАЦИИ МИКРОБНОЙ БИОПЛЕНКИ КОРНЕВЫХ КАНАЛОВ ПРИ ЭНДОДОНТИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава РФ, 127473, Москва

Частота осложнений по результатам эндодонтического лечения хронических форм пульпита и периодонтита остается высокой — от 32 до 50%, что связывают со свойствами микробной биопленки. Исследования этого объекта в корневых каналах и методов эрадикации биопленок находятся в начальной фазе исследования.

Цель — лабораторное обоснование и оценка эффективности комплексного воздействия ультразвуковой обработки и фотоактивируемой дезинфекции корня зуба при хронических формах пульпита и периодонтита, а также оценка эффективности эндодонтического лечения с применением сканирующей электронной микроскопии.

Микрофлору корневых каналов изучали бактериологическим методом (4 бактериальных и 2 грибковых клинических изолята). Влияние ультразвуковой обработки в комплексе с системой, фотоактивируемой дезинфекцией, на микрофлору корневого канала оценивали с использованием биореактора. Исследование биопленок системы корневых каналов зуба у больных хроническими формами пульпита (52 человека) и периодонтита (16 человек) проведены с использованием сканирующей электронной микроскопии.

*Установлены наличие обильной микробной биопленки в устьях денгинных канальцев и obturation денгинных канальцев в отдельных случаях. Описаны особенности формирования кривых роста популяций бактерий оральной микрофлоры (*Porphyromonas gingivalis*; *Fusobacterium nucleatum*; *Streptococcus sanguinis*; *Streptococcus mutans*; *Candida albicans*; *Candida krusei*) в результате комплексного воздействия фотодинамической активации и ультразвука по сравнению с контролем без такового. Комплексное воздействие угнетает рост микробных популяций оральных бактерий и грибов рода *Candida*.*

Ключевые слова: *корневые каналы; микробная биопленка; сканирующая электронная микроскопия; эндодонтическое лечение; ультразвуковая ирригация; фотодинамическая терапия; биореактор; анти-микробная активность in vitro.*

Для цитирования: Царев В.Н., Подпорин М.С., Ипполитов Е.В. Применение сканирующей электронной микроскопии и биореактора для оценки эрадикации микробной биопленки корневых каналов при эндодонтическом лечении. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (8): 506-512. DOI:<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-506-512>

Tsarev V.N., Podporin M.S., Ippolitov E.V.

THE APPLICATION OF SCANNING ELECTRONIC MICROSCOPY AND BIO-REACTOR FOR EVALUATING ERADICATION OF MICROBIAL BIOFILM OF ROOT CHANNELS UNDER ENDODONTIC TREATMENT

The A.E. Evdokimov Moscow state medical stomatological university, 127473 Moscow, Russia

Для корреспонденции: Царев Виктор Николаевич, д-р мед. наук, проф., дир. НИМСИ, зав. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ, e-mail: nikola777@rambler.ru

According to the results of endodontic treatment of chronic forms of odontitis and periodontitis the rate of complications continues to be high - from 32% to 50% that is related to characteristics of microbial bio-film. The studies of this object in root canals and methods of eradication of bio-films are at their initial stage.

The purpose of study is to provide a laboratory substantiation and evaluation of efficacy of complex effect of ultrasound processing and photo-activating disinfection of root of tooth in case of chronic forms of odontitis and periodontitis and also evaluation of endodontic treatment using scanning electronic microscopy.

The micro-flora of root canals was examined using bacteriological method (4 bacterial and 2 fungous clinical isolates). The effect of ultrasound processing in complex with the system, photo-activating disinfection on micro-flora of root canal was evaluated using a bio-reactor. The analysis of bio-films of system of root canals of tooth in patients with chronic forms of odontitis (52 patients) and periodontitis (16 patients) are implemented using scanning electronic microscopy.

The established availability of abundant microbial bio-film in orifices of dentinal tubules and obturation of dentinal tubules in particular cases. The features of formation of curves of growth of population of bacteria of oral micro-flora (*Porphyromonas gingivalis*; *Fusobacterium nucleatum*; *Streptococcus sanguinis*; *Streptococcus mutans*; *Candida albicans*; *Candida krusei*) as a result of complex effect of photo-dynamic activation and ultrasound as compared with control without such. The complex effect inhibits growth of microbial populations of oral bacteria and fungi species *Candida*.

Key words: root canals; microbial bio-film; scanning electronic microscopy; endodontic treatment; ultrasound irrigation; photo-dynamic therapy; bio-reactor; anti-microbial activity in vitro

For citation: Tsarev V.N., Podporin M.S., Ippolitov E.V. The application of scanning electronic microscopy and bio-reactor for evaluating eradication of microbial bio-film of root channels under endodontic treatment. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (8): 506-512. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-8-506-512>

For correspondence: Tsarev V.N., doctor of medical sciences, professor, director; head of the chair of microbiology, virology, immunology. e-mail: nikola777@rambler.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 07.10.2016
Accepted 21.10.2016

Эндодонтическое лечение осложнений кариеса (пульпитов и апикальных периодонтитов) — один из самых востребованных методов оказания медицинской помощи как в Российской Федерации, так и во многих других странах. По данным Е.В. Боровского и П.А. Леуса (1998), обращаемость населения по поводу лечения пульпита и периодонтита в странах СНГ составила более 35% всех посещений стоматологических поликлиник [1]. В России обращения в стоматологические поликлиники по поводу лечения осложнений кариеса — наиболее частый случай, который в структуре оказания стоматологической помощи, по данным Митронина А.В. и соавт. (2009), составляет от 20 до 30% [2]. Причиной возникновения некроза пульпы и его прогрессирования служит бактериальная инфекция. Причем, по данным литературы, отличительной особенностью некроза пульпы зуба становится выраженное преобладание стрептококковой флоры над стафилококковой [3].

В стремительно развивающихся технологиях аэробной и анаэробной культивации исследователи высказывают единодушное мнение, что осложнения кариеса имеют полибактериальный характер. Среди патогенов, колонизирующих корневые каналы, выделяют грамотрицательные облигатно-анаэробные палочки группы *Bacteroides*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Eubacterium alactolyticum*, *Eubacterium lentium*, *Wolinella recta*, *Campylobacter sputorum* (составляют 85% общего числа возбудителей). Существенное место занимают также микроаэрофильные стрептококки групп *sanguinis* и *mutans* [4].

Эндодонтическая обработка каналов остается основным этапом в комплексной терапии заболеваний пульпы. Оттого, как проведен этот этап, напрямую зависят отдаленные результаты лечения. Зачастую определяющую роль в недопущении дальнейших осложнений эндодонтического лечения играет эффективная и качественная инструментальная обработка при пульпите. Основной протокол лечения может быть дополнен физиотерапевтическими методами воздействия на область корневых каналов, в частности использованием физических факторов: ультразвука, медицинского озона и фотохимической реакции [1].

В последние годы установлено, что сохранение жизнеспособных бактерий в системе дентинных канальцев может быть связано с формированием микробных биопленок на уровне так называемого «смазанного слоя», которые препятствуют или нейтрализуют действие антисептических препаратов [5].

В связи с остротой этой проблемы предложено использование дополнительных физических воздействий, которые, по мнению авторов, способствуют разрушению биопленки. Один из наиболее популярных в настоящее время — метод фотоактивируемой дезинфекции. Он основан на использовании различных фотобиологических эффектов, вызываемых посредством сочетанного применения светового излучения, кислорода и фотосенсибилизатора [6].

Особое значение приобретает также качественная ирригация корневых каналов с активацией ирриганта с помощью ультразвукового файла пьезоэлектрической группы, что, возможно, повышает эффективность эндодонтического лечения с точки зрения очистки стенок дентинных канальцев, особенно, в области апекса [7]. Вместе с тем четких клинико-лабораторных доказательств формирования биопленок в системе дентинных канальцев и их разрушения в процессе указанных видов воздействия в зарубежной литературе не много [8], а в отечественной — и вовсе нет.

Цель нашего исследования — лабораторное обоснование применения комплексного воздействия ультразвуковой обработки и фотоактивируемой дезинфекции в экспериментах *in vitro* с использованием штаммов микроорганизмов, выделенных у пациентов с хроническими формами пульпита и периодонтита.

Материал и методы. Всего обследованы 52 пациента с диагнозом «хронический пульпит», в том числе: 26 с диагнозом «хронический фиброзный пульпит» (ХФП) и 26 с хроническим гангренозным пульпитом (ХГП); 16 пациентов с диагнозом «хронический периодонтит в фазе обострения». Возраст пациентов составил от 25 до 45 лет (для чистоты эксперимента, так как у пациентов более старшего возраста была выявлена общесоматическая патология); мужчин и женщин — 35 и 32 человек соответственно.

Всем пациентам проводили традиционную методику эндодонтического лечения, которая сопровождалась взятием материала для проведения сканирующей электронной микроскопии системы дентинных канальцев (СЭМ).

Этапы эндодонтического лечения в соответствии с протоколом Европейского общества эндодонтистов: обезболивание и установка коффердама; иссечение и удаление инфицированных твердых тканей зуба, формирование доступа к пульпарной камере; вскрытие и раскрытие пульпарной камеры; расширение устья корневых каналов, создание в верхней трети воронкообразной формы; экстирпация корневой пульпы; определение рабочей длины зуба; механическая и медикаментозная обработка корневого канала; высушивание корневых каналов; пломбирование корневых каналов.

В экспериментальной части исследования для оценки воздействия ультразвуковой активацией ирриганта на штаммы микроорганизмов использовали аппарат пьезоэлектрической группы Ultrasonic DTE-D5, а для проведения фотоактивируемой дезинфекции — аппарат Fotosan 360 с применением в качестве фотосенсибилизатора толуидинового синего.

Структуру биопленки корневых каналов изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием двухлучевого микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, USA) в режиме высокого вакуума, при ускоряющих напряжениях 5 и ЮкV, с предварительным напылением золотом (999) в установке SPI-Module Sputter/Carbon Coater System (SPI Inc., USA).

Микробиологическое изучение патологического содержимого корневых каналов осуществляли с помощью бактериологического метода исследования, включавшего в обязательном порядке анаэробное культивирование, путем количественных высевов на питательную среду M144 (Hi-media, Индия) с добавлением крови (для культивирования грамотрицательных анаэробных и грамположительных микроаэрофильных бактерий) и M1297A (Hi-media, Индия) для грибов рода *Candida*.

Посевы помещали в термостат при температуре 37°C на 48 ч (для анаэробных культур — в анаэрогат на 7 сут), после чего использовали автоматическую систему по подсчету количества колоний Scan 500 (Interscience, Франция).

Из числа выделенных штаммов для экспериментальной части исследования были отобраны наиболее часто встречающиеся у наших пациентов (4 бактериальных и 2 грибковых клинических изолята): *Porphyromonas gingivalis*; *Fusobacterium nucleatum*; *Streptococcus sanguinis*; *Streptococcus mutans*; *Candida albicans*; *Candida krusei*.

В экспериментальной части исследования проводили оценку влияния ультразвуковой обработки в комплексе с системой фотоактивируемой дезинфекции на микрофлору корневого канала с использованием биореактора «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия). В настоящем исследовании данная система, предназначенная для культивирования микроорганизмов и оценки их роста в режиме реального времени, использована нами впервые в отечественной практике для культивирования анаэробных бактерий пародонтопатогенной группы, стрептококков и грибов рода *Candida* (рис. 1).

Интерпретацию результатов проводили по изменению оптической плотности при длине волны $\lambda = 850$ нм.

Для определения чувствительности выделенных штаммов применяли собственную модификацию метода серийных разведений, разработанную на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

В стерильные пластиковые пробирки Eppendorf помещали в равном соотношении взвесь испытуемого штамма и фотосенсибилизатор (по 0,20 мл соответственно), что в конечном количестве равнялось 10^6 КОЕ (колониеобразующих единиц) (в логарифмическом выражении 6 соответственно). Концентрация ФС — средняя (*med*), экспозиций ультразвуковой обработки — 10 с.



Рис. 1. Система культивирования микроорганизмов «Реверс-Спиннер RTS-1» (BioSan, Латвия).

При проведении эксперимента первоначально помещали наконечник ультразвукового аппарата непосредственно в бактериальную взвесь, включали на необходимый период времени, а затем добавляли ФС и помещали наконечник диодного аппарата и световое излучение на 30 с (в соответствии с инструкцией). В качестве контроля использовали бактериальную взвесь без последующей дальнейшей ее обработки.

Для культивирования микроорганизмов в биореакторе использовали два типа пробирок: 50 мл с мембранным фильтром (TubeSpin) для аэробов и 50 мл по типу Falcon с крышкой без мембраны. В каждую пробирку добавляли 15 мл питательной среды и вносили заранее подготовленную бактериальную взвесь с помощью биохимической пипетки.

Пробирки помещали в биореактор и с помощью программного обеспечения задавали необходимые параметры культивирования в соответствии с разработанными рекомендациями.

Для каждого вида микроорганизмов использовали свои настройки биореактора:

- *Porphyromonas gingivalis* (Temperature: 37°C; RPM: 1200 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 1 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm);
- *Fusobacterium nucleatum* (Temperature: 37°C; RPM: 1200 min⁻¹; Measurement freq.: 2 h⁻¹; Rev. Spin period: 2 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm);
- *Streptococcus sanguis* (Temperature: 37°C; RPM: 1500 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 2 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm);
- *Streptococcus mutans* (Temperature: 37°C; RPM: 1700 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 2 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm);
- *Candida albicans* (Temperature: 37°C; RPM: 1300 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 3 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm);
- *Candida krusei* (Temperature: 37°C; RPM: 1300 min⁻¹; Measurement freq.: 3 h⁻¹; Rev. Spin period: 3 sec; Volume: 15 ml λ : 850 nm).

Культивирование проводили для грибов в течение 2 сут, для пародонтопатогенных видов бактерий и стрептококков — в течение 5 сут. Регистрацию точек кривой роста — каждые 4 ч.

Результаты эксперимента отображали в графике динамики изменения оптической плотности на протяжении всего периода культивирования. По ключевым точкам кривых роста микробных популяций проводили статистическую обработку данных в

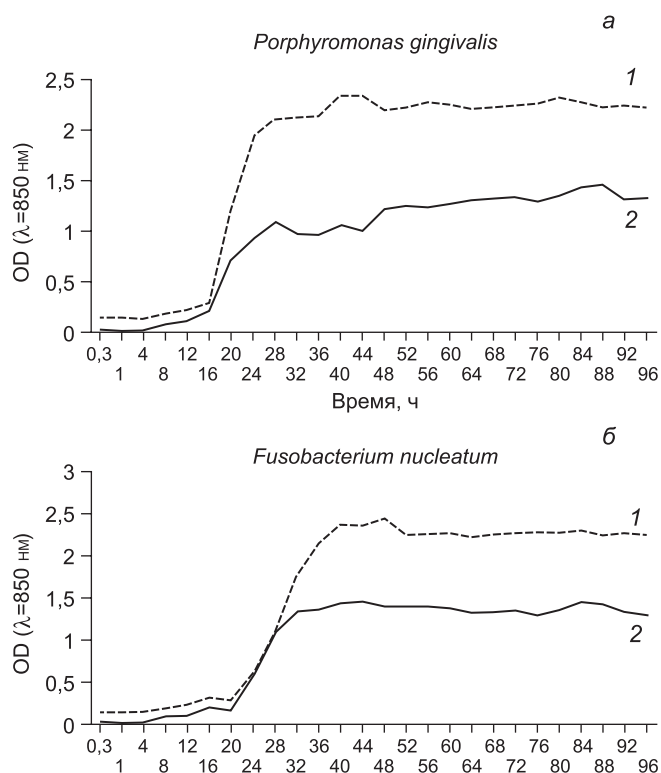


Рис. 2. Оценка чувствительности штаммов грамотрицательных бактерий к комплексному физиотерапевтическому воздействию: ультразвуковая (УЗ) + фотодинамическая (ФДТ) обработка *in vitro* (а — *Porphyromonas gingivalis*; б — *Fusobacterium nucleatum*). Кривая 1 — контроль; кривая 2 — УЗ + ФДТ.

5 повторах и обрабатывали методом параметрической статистики для малой выборки по Манну—Уитни ($p \leq 0,05$).

Результаты. Оценка чувствительности к ультразвуковой обработке в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией грамотрицательных анаэробных бактерий с использованием собственного модифицированного метода разведений показала следующее (рис. 2).

На представленных графиках видно, что лаг-фаза, охватывающая промежуток от момента посева бактерий до видимого начала их роста, продолжалась в среднем одинаково у всех исследуемых штаммов — в пределах суток. Так, для *Porphyromonas gingivalis* начало роста отмечалось на 16-й час культивирования, а для *Fusobacterium nucleatum* на 20-й час — как в контрольной, так и исследуемой пробе. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза, характеризующаяся прогрессирующим нарастанием скорости деления клеток, имела достоверные отличия как по достижению максимума биомассы (определяемой при данной методике по оптической плотности — OD), так и по скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности контрольной пробы составили: *Porphyromonas gingivalis* — 2,37 OD (40 h); *Fusobacterium nucleatum* — 2,45 OD (48 h). Задержка логарифмической фазы и переход в стационарную фазу в исследуемых пробах наблюдали еще через 20—28 ч культивирования. Показатели пикового максимума оптической плотности исследуемой пробы составили: *Porphyromonas gingivalis* — 1,47 OD (88 h); *Fusobacterium nucleatum* — 1,46 OD (44 h) соответственно.

Оценка чувствительности к ультразвуковой обработке в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией штаммов грамположительных бактерий показала следующее (рис. 3).

На графиках видно, что лаг-фаза, продолжалась немного

дольше, чем у грамотрицательных бактерий, и отмечалась на 24-й час культивирования в контрольной и исследуемой пробе. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза также имела достоверные отличия: как по достижению максимума биомассы, так и по скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности контрольной пробы составили: *Streptococcus sanguis* — 2,39 OD (40 h); *Streptococcus mutans* — 2,49 OD (48 h). Задержка логарифмической фазы и переход к стационарной фазе в исследуемых пробах наблюдали в промежутке от 32 до 40 ч культивирования. Наиболее чувствительным к УЗ и ФД обработке оказался *Streptococcus sanguis* — максимум отмечен на 36-й час и составил 1,58 OD; более устойчивым оказался *Streptococcus mutans* — 2,01 OD (44 h).

Оценка чувствительности к ультразвуковой обработке в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией штаммов грибов *Candida* показала следующее (рис. 4).

В экспериментах с грибами рода *Candida* видно, что лаг-фаза, продолжалась не более 6 ч как в контрольной, так и в исследуемой пробе. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза была для разных видов различна, особенно в скорости прироста клеток. Показатели пикового максимума оптической плотности в контрольной пробе составили: *Candida albicans* — 7,81 OD (58 h); *Candida krusei* — 8,5 OD (62 h). Задержку логарифмической фазы в исследуемых пробах наблюдали на промежутке от 14 до 34 ч культивирования, причем у *Candida krusei* к 14 ч существенно снизилась скорость прироста клеток, а задержка лог-фазы отмечалась только на 34-й час. Наиболее чувствительным к УЗ и ФД обработке оказался *Candida albicans* — максимум был отмечен на 22-й час и составил 5,61 OD; более устойчивым оказался *Candida krusei* — 6,56 OD (42 h).

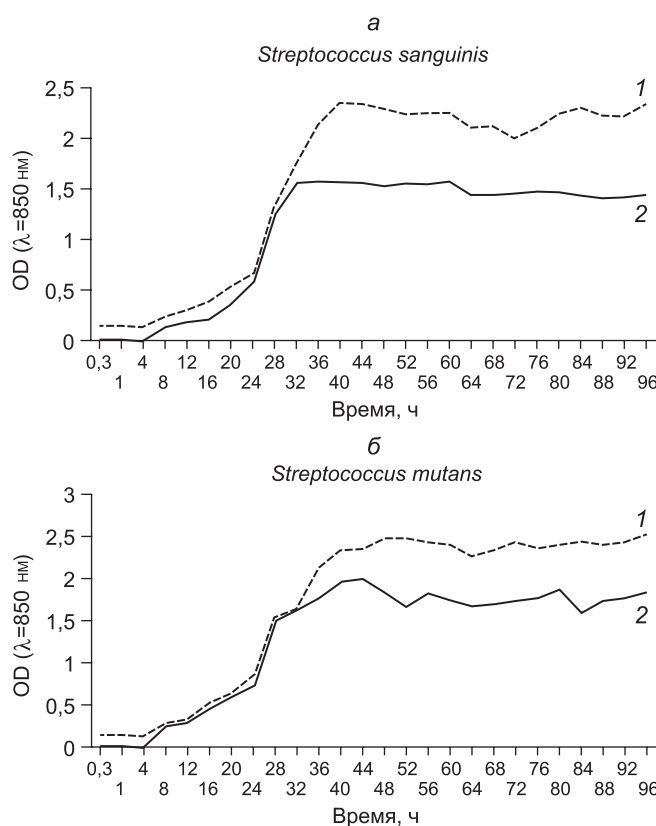


Рис. 3. Оценка чувствительности штаммов грамположительных бактерий к комплексному физиотерапевтическому воздействию: ультразвуковая (УЗ) + фотодинамическая (ФДТ) обработка *in vitro* (а — *Streptococcus sanguinis*; б — *Streptococcus mutans*). Кривая 1 — контроль; кривая 2 — УЗ + ФДТ.

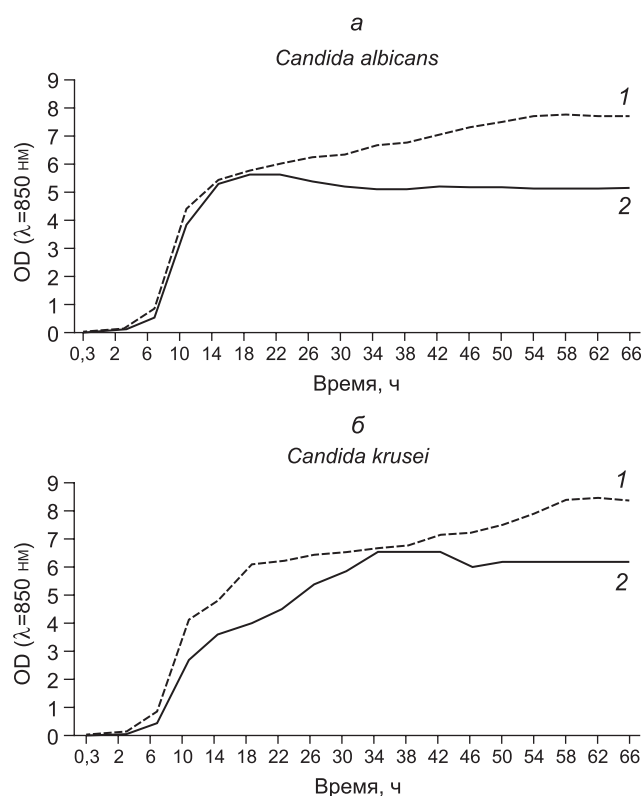


Рис. 4. Оценка чувствительности штаммов дрожжевых грибов рода *Candida* к комплексному физиотерапевтическому воздействию: ультразвуковая (УЗ) + фотодинамическая (ФДТ) обработка *in vitro* (а — *Candida albicans*; б — *Candida krusei*). Кривая 1 — контроль; кривая 2 — УЗ + ФДТ.

Сравнительная оценка чувствительности исследуемых штаммов в эксперименте *in vitro* к ультразвуковой обработке (УЗ) в комплексе с фотоактивируемой дезинфекцией (ФД) представлена в таблице.

Сравнительная характеристика количественных параметров (по оптической плотности) роста микробных популяций с учетом узловых точек кривой роста

Штамм	<i>P.gingivalis</i>		<i>F.nucleatum</i>		<i>S.sanguinis</i>		<i>S.mutans</i>		<i>C.albicans</i>		<i>C.krusei</i>	
	Конт- роль	ФД + УЗ	Конт- роль	ФД + УЗ	Контроль	ФД + УЗ	Контроль	ФД + УЗ	Контроль	ФД + УЗ	Контроль	ФД + УЗ
Начало подъема лаг-фазы	0,19 ± 0,04	0,09* ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,09* ± 0,03	0,24 ± 0,04	0,15* ± 0,04	0,30 ± 0,04	0,27 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,07 ± 0,03
Середина лаг-фазы роста	0,32 ± 0,04	0,21* ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,15* ± 0,02	0,67 ± 0,04	0,57* ± 0,04	0,54 ± 0,04	0,61 ± 0,04	0,85 ± 0,04	0,53* ± 0,04	0,8 ± 0,05	0,46* ± 0,04
Начало подъема стационарной фазы роста	2,13 ± 0,05	0,93* ± 0,04	2,37 ± 0,05	1,34* ± 0,04	2,37 ± 0,05	1,56* ± 0,04	2,37 ± 0,05	1,8* ± 0,03	6,69 ± 0,05	5,28* ± 0,05	6,1 ± 0,05	5,89* ± 0,05
Средний показатель стационарной фазы	2,26 ± 0,05	1,22* ± 0,03	2,28 ± 0,05	1,37* ± 0,03	2,23 ± 0,05	1,51* ± 0,03	2,42 ± 0,05	1,79* ± 0,04	7,38 ± 0,05	5,24* ± 0,05	7,23 ± 0,05	6,27* ± 0,05

Примечание. * — достоверное снижение показателя при исследуемом физическом воздействии ($p < 0,05$).

При проведении сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) установлено наличие высокого уровня микробной контаминации зоны корневого канала и дентинных канальцев. На микрофотографии при увеличении в 1500 раз видны устья дентинных канальцев, которые obturированы скоплениями микроорганизмов, формирующих биопленку (рис. 5). При увеличении в 5000 раз хорошо различимы палочковидные (бактероидные) микробные клетки и округлые дрожжевые элементы грибов (рис. 6).

При хемомеханической эндодонтической обработке формируется «смазанный слой», содержащий остатки разрушенной биопленки и микроорганизмы, что подтверждается сканирующей электронной, проведенной после эндодонтической обработки (рис. 7). Очевидно, что смазанный слой служит своего рода питательной средой для микроорганизмов, поэтому легко восстанавливается без дополнительной эндодонтической дезинфекции. Смазанный слой также может нарушать адгезию пломбировочных материалов к стенкам корневых каналов.

Обсуждение. Как известно, система корневого канала зуба часто имеет сложную морфологию, особенно жевательной группы зубов. От основного канала на разных уровнях отходит множество латеральных канальцев. Основной канал в апикальной части образует дельту и открывается на верхушке корня не одним, а несколькими апикальными отверстиями [9].

Согласно современной концепции, ассоциации микроорганизмов полости рта колонизируют экосистему корневых каналов в виде биопленки, что существенно изменяет их свойства и затрудняет их удаление из системы корневых каналов [8]. Биопленка представляет собой сообщество микроорганизмов, окруженных внеклеточным полисахаридным матриксом и прикрепленных к влажной поверхности. Плотное прикрепление биопленки защищает присутствующие в ней микроорганизмы от воздействия неблагоприятных факторов, тем самым создавая благоприятные условия для размножения микроорганизмов. Полисахаридный матрикс служит специфическим барьером для проникновения внутрь биопленки антибактериальных агентов, в связи с чем повышается резистентность микробов к антисептикам и антибиотикам [10].

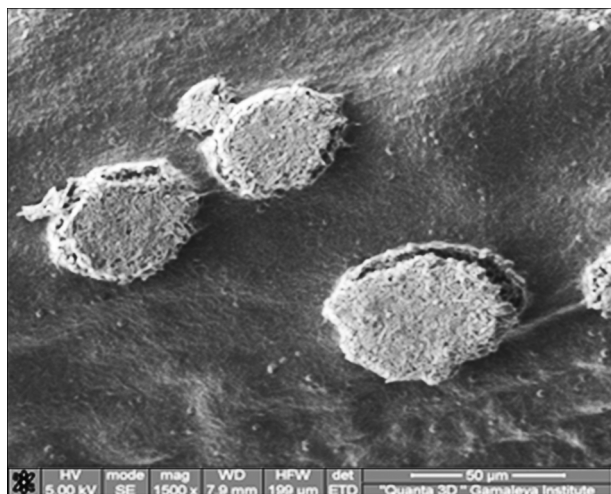


Рис. 5. Микробная obturation дентинных канальцев. Сканирующая электронная микроскопия. Видны obturированные устья трех канальцев (ув. $\times 1500$).

Полученные в нашем исследовании результаты позволяют предположить, что любой из представителей микрофлоры, колонизирующей поверхность зуба, может контаминировать кариозную полость и проникнуть в пульпу зуба и далее — в систему дентинных канальцев, что становится причиной воспалительного процесса.

По данным наших предыдущих исследований, из системы дентинных каналов могут выделяться с высокой частотой (от 50 до 90%) представители облигатно-анаэробных видов — *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptococcus niger*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Tannerella forsythia*, но с меньшей (от 25 до 40%) — представители преимущественно микроаэрофильных видов — *Streptococcus sanguinis*, *Propionibacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, а также некоторых облигатно-анаэробных — *Streptococcus intermedius*, *Treponema denticola*, *Eubacterium spp.* При этом частота выделения стафилококка составляла всего лишь 6,2%, энтерококка — 24,1%, а грибов рода *Candida* — 13,8% [5].

Считается доказанным, что применение ультразвуковой

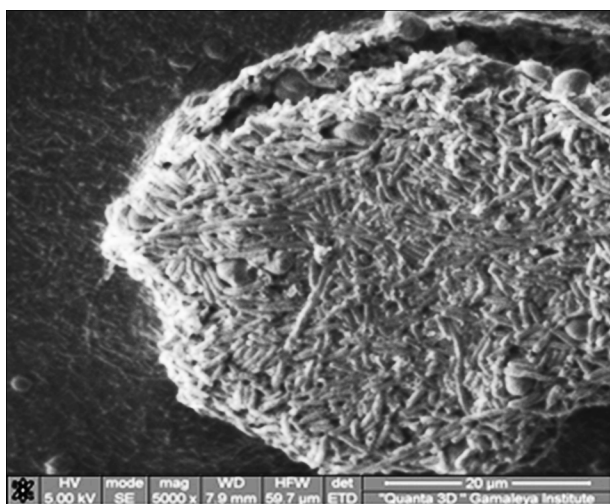


Рис. 6. Микробная obturation дентинных канальцев. Сканирующая электронная микроскопия. Видно obturированное устье одного из канальцев (ув. $\times 5000$).

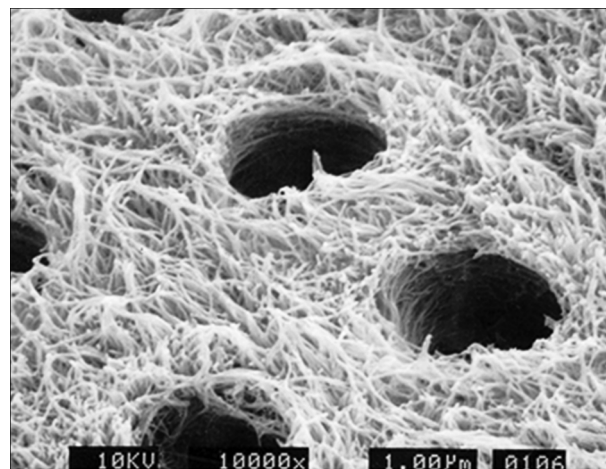


Рис. 7. «Смазанный слой» корневого канала с микробной биопленкой. Сканирующая электронная микроскопия (ув. $\times 10\,000$).

активации ирриганта в процессе обработки корневых каналов служит более эффективной методикой по сравнению с традиционным ручным методом обработки [11]. В эндодонтии ультразвук стали применять благодаря эффекту кавитации (в жидкой среде — формирование пузырьков пара, сопровождающееся шумом и гидравлическими ударами) и акустическим вихревым потокам, возникающим вокруг эндодонтического файла в процессе работы. Вихревые потоки разбивают детрит корневого канала на опилки и нагревают дезинфицирующий раствор, что значительно повышает качество эндодонтического лечения и создает условия для герметичной obturation корневого канала пломбировочными материалами [5, 12].

Заключение. При проведении сканирующей электронной микроскопии подтверждено наличие обильной микробной колонизации смазанного слоя в области устьев дентинных канальцев корня зуба, имеющей признаки микробной биопленки, представленной ассоциацией бактериальных и дрожжевых клеток. Установлена obturation пролиферирующей микробной биопленкой устьев дентинных канальцев, что служит показанием для применения физических методов воздействия для более полноценной эрадикации микробной флоры дентинных канальцев.

Как показали наши исследования *in vitro*, фотоактивируемая дезинфекция в комплексе с ультразвуковой активацией ирриганта по-разному влияет на процесс размножения микробных клеток штаммов — представителей нормальной микрофлоры полости рта и пародонтопатогенной группы бактерий, а также на размножение грибов рода *Candida*. Но во всех случаях имеет место бактериостатический эффект, выражающийся в торможении размножения бактерий или грибов по сравнению с контрольными образцами.

При анализе динамики роста популяций бактерий и грибов у них были установлены различия в наступлении основных фаз кривой роста популяции, максимума размножения (стимуляции роста) и перехода к стационарной фазе. Кривые роста бактериальных популяций *in vitro* во всех случаях (со всеми использованными штаммами бактерий и дрожжевых грибов) после фотодинамической и ультразвуковой обработки демонстрировали явное снижение по сравнению с контрольными образцами.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п. 11 см. REFERENCES)

1. Боровский Е.В., Макеева И.М., Жохова Н.С. Рабочая длина зуба и методы ее определения. *Клиническая стоматология*. 1998; (2): 8—11.
2. Митронин А.В., Чунихин А.А. Важные аспекты применения диодного лазера при эндодонтическом лечении хронического пульпита. Анализ клинико-лабораторного исследования. *Российская стоматология*. 2011; 4(4): 34—40.
3. Бир Р., Бауман М., Ким С. *Эндодонтология*. Перевод с английского. М.: МЕДпрессинформ; 2004.
4. Олейник И.И. Микрофлора полости рта в норме и при развитии патологических процессов. В кн.: Боровский Е.В., Леонтьев В.К. *Биология полости рта*. Нижний Новгород: Медицинская книга; 2001: 226—61.
5. Царев В.Н., Дмитриева Л.А., Ипполитов Е.В., Нисанова С.Е. Последовательное применение антибактериальных и детоксицирующих препаратов при эндодонтическом лечении хронического апикального периодонтита (Клинико-экспериментальное исследование). *Эндодонтия Today*. 2013; (1): 8—14.
6. Царев В.Н., Митронин А.В., Ипполитов Е.В., Малазония Т.Т., Подпорин М.С., Манучарян Л.А. Оценка антимикробного действия фотодинамической терапии на возбудителей неклостридиальной анаэробной инфекции полости рта и грибы рода *Candida* в экспериментальных и клинических исследованиях. *Эндодонтия Today*. 2015; (3): 15—20.
7. Бородина Н.Б., Петрова Т.Г. Пути повышения эффективности ирригации корневых каналов с использованием аппарата P5 Newtron XS фирмы Satelec. *Новое в стоматологии*. 2009; (1): 2.
8. Ушаков Р.В., Царев В.Н. Микрофлора и иммунные процессы при одонтогенной инфекции. В кн.: Царев В.Н., ред. *Микробиология, вирусология и иммунология полости рта*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013: 455—500.
9. Роудз Д.С. *Повторное эндодонтическое лечение. Консервативные и хирургические методы*. Перевод с английского. М.: МЕДпрессинформ; 2009.
10. Ипполитов Е.В., Диденко Л.В., Царев В.Н. Особенности морфологии биопленки пародонта при воспалительных заболеваниях десен (хронический катаральный гингивит, хронический пародонтит, кандидо-ассоциированный пародонтит) по данным электронной микроскопии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(12): 59—64.
12. Хольгер Д. Ультразвук в эндодонтии. *Медицинский алфавит*. 2014; (1): 10—3.

REFERENCES

1. Borovskiy E.V., Makeeva I.M., Zhokhova N.S. The working length of the tooth and methods of its determination. *Klinicheskaya stomatologiya*. 1998; (2): 8—11. (in Russian)
2. Mitronin A.V., Chunikhin A.A. Important aspects of the diode laser in endodontic treatment of chronic pulpitis. Analysis of clinical and laboratory research. *Rossiyskaya stomatologiya*. 2011; 4(4): 34—40. (in Russian)
3. Beer R., Baumann M.A., Kim S. *Endodontology*. Stuttgart, New York: Thieme; 2000.
4. Oleynik I.I. Oral microflora in health and development of pathological processes. In: Borovskiy E.V., Leont'ev V.K. *Oral Biology [Biologiya polosti rta]*. Nizhny Novgorod: Meditsinskaya kniga; 2001: 226—61. (in Russian)
5. Tsarev V.N., Dmitrieva L.A., Ippolitov E.V., Nisanova S.E. Consistent application of antibacterial and detoxifying drugs in endodontic therapy of chronic apical periodontitis (clinical and experimental study). *Endodontiya Today*. 2013; (1): 8—14. (in Russian)
6. Tsarev V.N., Mitronin A.V., Ippolitov E.V., Malazoniya T.T., Podporin M.S., Manucharyan L.A. Evaluation of antimicrobial effect of photodynamic therapy agents non-clostridial anaerobic infection of the mouth and *Candida* species in experimental and clinical studies. *Endodontiya Today*. 2015; (3): 15—20. (in Russian)
7. Borodina N.B., Petrova T.G. Ways to improve the effectiveness of root canal irrigation using a device P5 Newtron XS company Satelec. *Novoe v stomatologii*. 2009; (1): 2. (in Russian)
8. Ushakov R.V., Tsarev V.N. Microflora and immune processes in odontogenic infection. In: Tsarev V.N., ed. *Microbiology, Virology and Immunology of the Oral Cavity [Mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya polosti rta]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2013: 455—500. (in Russian)
9. Rhodes J.S. *Advanced Endodontics Clinical Retreatment and Surgery*. London: Taylor and Francis Group; 2006.
10. Ippolitov E.V., Didenko L.V., Tsarev V.N. The morphology of periodontal biofilm in inflammatory diseases of the gums (chronic catarrhal gingivitis, chronic periodontitis, *Candida*-associated periodontitis) by electron microscopy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2015; 60(12): 59—64. (in Russian)
11. Plotino G., Pameijer C.H., Grande N.M., Somma F. Ultrasonic in endodontics: a review of the literature. *J. Endod.* 2007; 33(2): 81—95.
12. Khol'ger D. Ultrasound in endodontics. *Meditsinskiy alfavit*. 2014; (1): 10—3. (in Russian)

Поступила 07.10.16
Принята к печати 21.10.16

Уважаемые авторы и читатели журнала!

Обращаем ваше внимание на то, что мы обновили сайт нашего журнала, новый адрес сайта: www.medlit.ru/journalsview/lab

Теперь вы можете подписаться через наш сайт на электронную версию журнала или купить отдельные статьи по издательской цене. Для этого нужно пройти регистрацию на сайте.